

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/019983 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00,  
A61P 3/10 // C07K 7/06, C12N 9/64

〒134-8630 東京都江戸川区北葛西一丁目16番  
13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内  
Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011046

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 29 日 (29.08.2003)

(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京都  
千代田区岩本町 3 丁目 2 番 10 号 SN 岩本町ビル  
6 階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-254973 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002) JP  
特願2003-96370 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP  
特願2003-96371 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP  
特願2003-96372 2003 年 3 月 31 日 (31.03.2003) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): セレス  
ター・レキシコ・サイエンス株式会社 (CELESTAR  
LEXICO-SCIENCES, INC.) [JP/JP]; 〒261-8501 千葉県  
千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地 幕張テクノガーデン  
D 棟 1 7 階 Chiba (JP). 第一製薬株式会社 (DAIICHI  
PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8234  
東京都中央区日本橋三丁目 1 4 番 10 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土居 洋文  
(DOI, Hirofumi) [JP/JP]; 〒261-8501 千葉県 千葉市  
美浜区中瀬 1 丁目 3 番地 幕張テクノガーデン D  
棟 1 7 階 セレスター・レキシコ・サイエンス  
株式会社内 Chiba (JP). 工藤 玄 (KUDO, Gen) [JP/JP];

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DEGRADING TRANSCRIPTIONAL FACTORS OF SACCHAROMETABOLISM-ASSOCIATED  
GENE, METHOD OF INHIBITING THE DEGRADATION AND DEGRADATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤

(57) Abstract: It is found out that m-calpain or  $\mu$ -calpain degrades hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  (HNF-4  $\alpha$ ), hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$  (HNF-1  $\alpha$ ) and insulin promoter factor 1 (IPF-1) which form a transcriptional factor network participating in the expression of a saccharomyces-associated gene in pancreatic  $\beta$ -cells. Thus, a method of degrading these transcriptional factors; a method of inhibiting the degradation; a degradation inhibitor; a promoter for the production of a gene product of a gene on which these factors serve as transcriptional factors and a method of promoting the production; a preventive and/or a remedy for a disease caused by the degradation of these transcriptional factors and a method of preventing and/or treating the same; a method of identifying a compound inhibiting the degradation of these transcriptional factors by calpain; a compound obtained by the identification method; and a reagent kit containing calpain, these transcriptional factors, polynucleotides encoding these transcriptional factors, and a vector containing these polynucleotides; are provided.

(57) 要約: m-カルパインまたは  $\mu$ -カルパインが、膵臓  $\beta$  細胞において糖代謝関連遺伝子の発現に関与する転写因子ネットワークを形成する、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$  (HNF-4  $\alpha$ )、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  (HNF-1  $\alpha$ ) およびインシュリンプロモーターファクター 1 (IPF-1) を分解することを見出し、これら転写因子の分解方法; 分解阻害方法; 分解阻害剤; これらが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物産生促進剤および産生促進方法; これら転写因子の分解に起因する疾患の防止剤および/または治療剤並びに防止方法および/または治療方法; カルパインによるこれら転写因子分解を阻害する化合物の同定方法; 該同定方法で得られた化合物; さらにカルパイン、これら転写因子、これら転写因子をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットを提供した。

## 明細書

糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤

## 5 技術分野

本発明は、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解方法、分解剤、分解阻害方法および分解阻害剤に関する。より詳しくは、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$  (h e p a t o c y t e n u c l e a r f a c t o r 4 $\alpha$ 、以下HNF-4 $\alpha$ と略称する。)、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$  (h e p a t o c y t e n u c l e a r f a c t o r 1 $\alpha$ 、以下HNF-1 $\alpha$ と略称する。) およびインシュリンプロモーターファクター1 (i n s u l i n p r o m o t e r f a c t o r 1、以下IPF-1と略称する。) の分解方法、分解剤、分解阻害方法および分解阻害剤に関する。より具体的にはカルパイン (c a l p a i n)、好ましくはm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインを用いることを特徴とするHNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1の分解方法および分解剤に関する。また、カルパイン、好ましくはm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるHNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1の分解阻害方法および分解阻害剤に関する。さらに、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1のうちの少なくとも1つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法および  
20 産生促進剤に関する。また、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1のうちの少なくとも1つの分解に起因する疾患、例えば糖尿病の防止方法および／または治療方法並びに防止剤および／または治療剤に関する。さらに、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1のカルパインによる分解を阻害する化合物の同定方法および該同定方法により同定された化合物に関する。また、カルパイン、  
25 HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ 、IPF-1、これらのいずれかをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットに関する。

## 背景技術

カルパイン (EC 3. 4. 22. 17) は、カルシウム依存性システインプロテアーゼであり、蛋白質を限定的に切断してその構造や機能を変化させる酵素である。カルパインには、構造的特徴、組織局在およびカルシウム要求性などによって分類される多くのアイソザイムが知られており、これらからなるスーパーファミリーを構成している。

m-カルパインは、カルパインスーパーファミリーの1つであり、カルパイン2とも呼ばれ、多くの組織で発現している (非特許文献1)。m-カルパインは1 mM程度のカルシウム濃度で活性化され、酵素活性を発現する。

$\mu$ -カルパインは、カルパイン1とも呼ばれ、m-カルパインと同様に多くの組織で発現している (非特許文献1および2)。 $\mu$ -カルパインは、m-カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、数十  $\mu$  M程度のカルシウム濃度で活性化され、その酵素活性を発現する。

m-カルパインおよび $\mu$ -カルパインにより分解される蛋白質としては、p53やレチノイドXレセプター (RXR) など多くの転写因子が報告されている (非特許文献3~5)。カルパインにより分解される蛋白質には、カルパインによって優先的に切断されるアミノ酸モチーフが存在する (非特許文献6)。例えば、ロイシン残基 (Leu) またはバリン残基 (Val) などの疎水性アミノ酸残基に続く、チロシン残基 (Tyr)、メチオニン残基 (Met) またはアルギニン残基 (Arg) とそれに続くアミノ酸残基との間で切断される。現在、いくつかのカルパイン阻害剤が市販されているが、このような切断モチーフを含むアミノ酸配列からなるペプチド N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO が m-カルパインの競合阻害剤として知られている (CALBIOCHEM社、非特許文献7)。また N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO は、 $\mu$ -カルパインの競合阻害剤として知られている (CALBIOCHEM社、非特許文献8)。その他、不可逆的カルパイン阻害剤である Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>

F (非特許文献 9)、Mu-Val-HPH-CH<sub>2</sub>F (非特許文献 10) および Leu-Leu-Pro-クロロメチルケトン (Chloromethyl ketone) (非特許文献 11)、可逆的カルパイン阻害剤である 4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO (非特許文献 12) などが市販されている (CALBIOCHEM 社)。

カルパインは細胞機能の調節に関与しているため、カルパインの活性制御の不全やその遺伝子の欠損などにより種々の疾患が引き起こされる。例えば、いくつかの糖尿病モデル動物では組織のカルパイン活性が亢進している (非特許文献 13 および 14)。カルパイン阻害剤により膵臓におけるグルコースに対するインシュリン分泌応答が増強されたことから、インシュリンの分泌と作用の調節へのカルパインの関与が示唆されている (非特許文献 15)。また、カルパイン 10 遺伝子の変異と 2 型糖尿病罹患率との間の関連性が指摘されている (非特許文献 16 および 17)。

m-カルパインおよび  $\mu$ -カルパインについては、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、脳卒中および白内障に関与していることが示唆されている (非特許文献 2)。

一方、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$  および IPF-1 はいずれも転写因子としての機能を有し、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化することが知られている。これらは例えば、膵臓の  $\beta$  細胞において転写因子ネットワークを形成し (非特許文献 18)、グルコーストランスポーター 2 (以下 GLUT 2 と略称することもある)、インシュリンおよびグルコキナーゼなどの糖代謝関連遺伝子の発現を制御すると考えられる。

HNF-4 $\alpha$  は核内レセプターであり、膵臓の  $\beta$  細胞、肝臓、腎臓および小腸で発現し、コレステロール、脂肪酸およびグルコースなどの代謝や肝臓の発生および分化に関与する物質をコードする種々の遺伝子の転写因子であることが知られている。HNF-4 $\alpha$  は、膵臓の  $\beta$  細胞における上記転写因子ネットワークに



において、特にHNF-1 $\alpha$ のポジティブレギュレーターとして機能し、インシュリン、GLUT2およびグルコキナーゼなどの糖代謝関連遺伝子の発現を制御する（非特許文献18～23）。従来、HNF-4 $\alpha$ のインシュリン遺伝子発現に対する作用は、HNF-1 $\alpha$ レベルの上昇を介した間接的なものであると考えられてきた。しかし、HNF-4 $\alpha$ が、インシュリン遺伝子プロモーター内で新規に見出されたシスエレメント（cis element）に結合し、直接的にその発現を調節することが報告された（非特許文献24）。

HNF-4 $\alpha$ 遺伝子については、遺伝性2型糖尿病MODY1（Maturity-onset diabetes of the young 1）の原因遺伝子であることが明らかにされている（非特許文献25および26）。

さらに、HNF-4 $\alpha$ 結合部位に自然変異を有するヒト遺伝子が、今までに複数同定されている。プロモーター内のHNF-4 $\alpha$ 結合部位に変異を有する変異体が見出されている遺伝子の1つは、上述のHNF-1 $\alpha$ をコードする遺伝子である。HNF-1 $\alpha$ プロモーターにおけるHNF-4 $\alpha$ 結合部位の変異によりHNF-4 $\alpha$ がプロモーターに結合せず、その結果HNF-1 $\alpha$ の発現が低減し、遺伝性2型糖尿病MODY3が惹起される（非特許文献27）。

かかる遺伝子としてはその他に、血液凝固に関与する因子である第VII因子および第IX因子をそれぞれコードする遺伝子が挙げられる。第IX因子遺伝子のプロモーターにおけるHNF-4 $\alpha$ 結合部位の変異は血友病の原因となる（非特許文献28および29）。また、第VII因子遺伝子のプロモーターにおけるHNF-4 $\alpha$ 結合部位の変異は重症第VII因子欠損症（severe factor VII deficiency）の患者で認められている（非特許文献30）。

HNF-1 $\alpha$ はトランスクリプションファクター1（TCF-1）とも呼ばれ、膵臓の $\beta$ 細胞、肝臓および腎臓などで発現し、多くの肝特異的遺伝子、例えばアルブミン、フィブリノーゲンや $\alpha$ 1アンチトリプシンなどの遺伝子発現を調節していることが知られている。HNF-1 $\alpha$ は、膵臓の $\beta$ 細胞における上記転写因

子ネットワークにおいて、IPF-1やHNF-4 $\alpha$ の転写を制御している（非特許文献21）。また、HNF-1 $\alpha$ が、GLUT2およびインシュリンなどの糖代謝関連遺伝子の発現を制御していることを示唆するデータが開示されている（非特許文献22）。例えば、HNF-1 $\alpha$ はGLUT2遺伝子のプロモーター領域に結合してその転写活性を亢進した（非特許文献22）。また、HNF-1 $\alpha$ はインシュリン遺伝子のプロモーターのA3領域に結合してその転写活性を亢進した（非特許文献31）。その他、ドミナントネガティブ体のHNF-1 $\alpha$ が膵臓 $\beta$ 細胞株でインシュリン分泌を低下させたことが報告されている（非特許文献32）。

HNF-1 $\alpha$ 遺伝子については、遺伝性2型糖尿病MODY3（Maturity-onset diabetes of the young 3）の原因遺伝子であることが明らかにされている（非特許文献33）。

HNF-1 $\alpha$ はまた、肝細胞腺腫（liver adenoma）との関連も指摘されている。例えば、アミノ変異によるHNF-1 $\alpha$ の不活性化が肝細胞腺腫の原因となることが示された（非特許文献34）。また、HNF-1 $\alpha$ のノックアウトマウスにおいて肝細胞の異常増殖による著しい肝肥大が認められた（非特許文献35）。肝細胞腺腫は肝細胞癌（hepatocellular carcinoma）へ形質転換する危険性を有する腫瘍なので、HNF-1 $\alpha$ の不活性化は肝細胞腺腫、ひいては肝細胞癌を誘発すると考えられる。

IPF-1はパンクレアス・デュオディナムホメオボックス1（Pancreas/duodenum homeobox 1; PDX-1）などとも呼ばれ、膵臓の $\beta$ 細胞および $\delta$ 細胞で発現している。HNF-4 $\alpha$ のプロモーター領域P2にはIPF-1結合部位が存在し、その変異が糖尿病の発症と相関することが報告されている（非特許文献36）。また、IPF-1がGLUT2（非特許文献37）、インシュリン（非特許文献38）、およびグルコキナーゼ（非特許文献39）などの糖代謝関連遺伝子の発現を制御していることを示唆するデータが開示されている。GLUT2遺伝子にはIPF-1が直接作用してその発現に関与する（非特許文献37）。

I P F - 1 遺伝子については、遺伝性 2 型糖尿病 MODY 4 ( M a t u r i t y - o n s e t d i a b e t e s o f t h e y o u n g 4 ) の原因遺伝子であることが明らかにされている ( 非特許文献 40 )。

以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

5 特許文献 1 : 国際公開第 WO 01 / 6 7 2 9 9 号パンフレット。

非特許文献 1 : 反町洋之、「生化学」 2000 年、第 72 巻、第 11 号、p. 1297 - 1315。

非特許文献 2 : Huang, Y. et al., 「TRENDS in Molecular Medicine」 2001 年、第 7 巻、p. 355 - 362。

10 非特許文献 3 : Matsushima - Nishiwaki, R. et al., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」 1996 年、第 225 巻、p. 946 - 951。

非特許文献 4 : Pariat, M., et al., 「Molecular and Cellular Biology」 1997 年、第 17 巻、p. 2806 - 2815。

非特許文献 5 : Watt F. et al., 「Nucleic Acids Research」 1993 年、第 21 巻、p. 5092 - 5100。

20 非特許文献 6 : Sasaki, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」 1984 年、第 259 巻、p. 12489 - 12494。

非特許文献 7 : Ravid, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」 2000 年、第 275 巻、p. 35840 - 35847。

25 非特許文献 8 : Debiasi, R. L. et al., 「Journal of Virology」 1999 年、第 73 巻、p. 695 - 701。

非特許文献 9 : Dutt, P. et al., 「FEBS Letter」 19

98年, 第436卷, p. 367-371。

非特許文献10: Esser, R. E. et al., 「Arthritis and Rheumatism」1994年, 第37卷, p. 236-247。

5 非特許文献11: Sasaki, T. et al., 「Journal of Biochemistry」1986年, 第99卷, p. 173-179。

非特許文献12: Nath, R. et al., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」2000年, 第274卷, p. 16-21。

10 非特許文献13: Brooks, B. A. et al., 「American Journal of Physiology」1983年, 第244卷, 第3号, p. C175-181。

非特許文献14: Kobayashi, S. et al., 「Endocrinologia Japonica」1989年, 第36卷, 第6号, p. 833-844。

15 非特許文献15: Sreeman, S. K. et al., 「Diabetes」2001年, 第50卷, p. 2013-2020。

非特許文献16: Horikawa, Y. et al., 「Nature Genetics」2000年, 第26卷, p. 163-175。

20 非特許文献17: Baier, L. J. et al., 「Journal of Clinical Investigation」2000年, 第106卷, p. R69-73。

非特許文献18: Shih, D. Q. et al., 「Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America」2001  
25 年, 第98卷, p. 14189-14191。

非特許文献19: 「BIO Clinica」2002年, 第17卷, p. 410-414。

非特許文献20: Stoffel, M. et al., 「Proceeding  
s of The National Academy of Science  
s of The United States of America」19  
97年, 第94巻, p. 13209-13214。

- 5 非特許文献21: Shih, D. Q. et al., 「Diabetes」20  
01年, 第50巻, p. 2472-2480。

非特許文献22: Ban, N. et al., 「Diabetes」2002年,  
第51巻, p. 1409-1418。

- 10 非特許文献23: Cah, J. Y. et al., 「Experimental  
and Molecular Medicine」2001年, 第33巻, 第2  
号, p. 59-63。

非特許文献24: Bartoov-Shifman, R. et al., 「Jo  
urnal of Biological Chemistry」2002年,  
第277巻, 第29号, p. 25914-25919。

- 15 非特許文献25: Ryffel, G. U. et al., 「Journal o  
f Molecular Endocrinology」2001年, 第27巻,  
p. 11-29。

非特許文献26: 「臨床病理」2001年、第49巻、第2号、p. 161-1  
64。

- 20 非特許文献27: Gragnoli, C. et al., 「Diabetes」  
1997年, 第46巻, p. 1648-1651。

非特許文献28: Sladek, F. M. et al., 「In Nuclea  
r Receptors and Genetic Disease」2001  
年, p. 309-361 Eds. TB Burris & ERB McCa  
25 be, San Diego; Academic Press。

非特許文献29: Marlene, J. R. et al., 「Procedi  
ngs of The National Academy of Scien

ces of The United States of America]  
1992年, 第89卷, p. 6300-6303。

非特許文献30: Carew, J. A. et al., 「BLOOD」2000年, 第15卷, p. 4370-4372。

- 5 非特許文献31: Okita, K. et al., 「Biochemical Biophysical Research communications」1999年, 第263卷, p. 566-569。

非特許文献32: Wang, H. et al., 「EMBO Journal」1998年, 第17卷, 第22号, p. 6701-6713。

- 10 非特許文献33: Yamagata, K. et al., 「Nature」1996年, 第384卷, p. 455-457。

非特許文献34: Bluteau, O. et al., 「Nature genetics」2002年, 第32卷, p. 312-315。

- 15 非特許文献35: Pontoglio, M. et al., 「Cell」1996年, 第84卷, p. 575-585。

非特許文献36: Thomas, H. et al., 「Human Molecular Genetics」2001年, 第10卷, 第19号, p. 2089-2097。

- 20 非特許文献37: Waeber, G. et al., 「Molecular Endocrinology」1996年, 第10卷, p. 1327-1334。

非特許文献38: Ohlsson, H. et al., 「EMBO Journal」1993年, 第12卷, p. 4251-4259。

非特許文献39: Watada, H. et al., 「Diabetes」1996年, 第45卷, p. 1478-1488。

- 25 非特許文献40: Stoffers, D. A. et al., 「Nature genetics」1997年, 第17卷, p. 138-141。

非特許文献41: Ulmer, K. M. 「Science」1983年, 第21

9 卷, p. 666-671。

非特許文献 42:「ペプチド合成」(日本国)、丸善株式会社、1975 年。

非特許文献 43:「ペプチド合成 (Peptide Synthesis)」(米国)、インターサイエンス、1996 年。

5 非特許文献 44: Bjorklund, A. et al., 「Diabetes」  
2000 年, 第 49 卷, p. 1840-1848。

非特許文献 45: Maruyama, K. et al., 「International Journal of Molecular Medicine」  
2000 年, 第 5 卷, p. 269-273。

10

#### 発明の開示

本発明においては、カルパインと相互作用する蛋白質を見出し、カルパインによる当該蛋白質の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供すべく種々の検討を重ねた。その結果、カルパインが転写因子の 1 つである HNF-4 $\alpha$  と相互作用することをインシリコで予測し、さらにカルパインによる HNF-4 $\alpha$  の分解を実験的に証明した。さらに、HNF-4 $\alpha$  と膵臓  $\beta$  細胞において転写因子ネットワークを形成する HNF-1 $\alpha$  および IPF-1 がカルパインにより分解されることを見出して、本発明を完成した。

すなわち本発明の一態様は、カルシウムの存在下、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを共存させることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解方法に関する。

また本発明の一態様は、カルシウム濃度により糖代謝関連遺伝子の転写因子分解程度を変えることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解方法に関する。

25 さらに本発明の一態様は、カルシウムの存在下、 $m$ -カルパインおよび／または  $\mu$ -カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを共存させることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター1 から選ばれる少なくとも1つである、前記いずれかの分解方法に関する。

- 5      また本発明の一態様は、カルシウムの存在下、m-カルパインおよび／または  $\mu$ -カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4  $\alpha$  (HNF-4  $\alpha$ ) を共存させることを特徴とする、HNF-4  $\alpha$  の分解方法に関する。

- さらに本発明の一態様は、カルシウムの存在下、m-カルパインおよび／または  $\mu$ -カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター1  $\alpha$  (HNF-1  $\alpha$ ) を  
10      共存させることを特徴とする、HNF-1  $\alpha$  の分解方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルシウムの存在下、m-カルパインおよび／または  $\mu$ -カルパインとインシュリンプロモーターファクター1 (IPF-1) を共存させることを特徴とする、IPF-1 の分解方法に関する。

- また本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害することを特徴とする糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。  
15

さらに本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子切断を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

- さらにまた本発明の一態様は、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子との結合を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。  
20

また本発明の一態様は、少なくともカルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

- 25      さらに本発明の一態様は、少なくともカルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを発現している細胞をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。



さらにまた本発明の一態様は、細胞が哺乳動物に担持されている細胞である前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

また本発明の一態様は、哺乳動物に担持されている細胞が膵臓β細胞である前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

- 5      さらに本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、糖代謝関連遺伝子の転写因子を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

- さらにまた本発明の一態様は、カルパインインヒビターが、N-Acetyl-  
10 -Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Cl  
またはZ-Val-Phe-CHOである前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解  
15 阻害方法に関する。

また本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害する物質がカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

- 20      さらに本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1から3のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり、且つカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

- 25      さらにまた本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位がLeu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-MetおよびVal-Argからなる群より選ばれるものであ

る前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

また本発明の一態様は、カルパインがm-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインである前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

さらに本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つである、前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、m-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ の分解阻害方法に関する。

また本発明の一態様は、m-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ の分解阻害方法に関する。

さらに本発明の一態様は、m-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とするインシュリンプロモーターファクター1の分解阻害方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパインを活性成分として有効量含んでなる糖代謝関連遺伝子の転写因子分解剤に関する。

また本発明の一態様は、カルパインがm-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインである前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解剤に関する。

さらに本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つである、前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、m-カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインを活性成分として有効量含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ の分解剤に関する。

また本発明の一態様は、 $m$ -カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインを活性成分として有効量含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ の分解剤に関する。

さらに本発明の一態様は、 $m$ -カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインを活性成分として有効量含んでなるインシュリンプロモーターファクター1の分解剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害することを特徴とする糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

また本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子切断を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

さらに本発明の一態様は、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子との結合を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害する物質を活性成分として有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

また本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、糖代謝関連遺伝子の転写因子を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

さらに本発明の一態様は、カルパインインヒビターが、 $N$ -Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、 $N$ -Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、 $Z$ -Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、 $Mu$ -Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Clまたは $Z$ -Val-Phe-CHOである前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害する物質がカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配

列を含むペプチドである前記糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害剤に関する。

また本発明の一態様は、カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号 1 から 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの連続する 3 つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位  
5 の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

さらに本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位が Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-Met および Val-Arg からなる群より選ばれるものである前  
10 記糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパインが m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインである前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤に関する。

また本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレ  
15 アーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つである、前記いずれかの分解阻害剤に関する。

さらに本発明の一態様は、m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$  分解阻  
20 害剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  分解阻害剤に関する。

また本発明の一態様は、m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインの活性  
25 を阻害することを特徴とする、インシュリンプロモーターファクター 1 分解阻害剤に関する。

さらに本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子の転写因子をカルパインを用いて

分解することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパインが $m$ -カルパインおよび／または $\mu$ -カルパインである前記糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法に関する。

- 5      また本発明の一態様は、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つの転写因子を $m$ -カルパインおよび／または $\mu$ -カルパインを用いて分解することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法に関する。

- 10      さらに本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子がインシュリン遺伝子またはグルコーストランスポーター2遺伝子である前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子分解を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法  
15      に関する。

また本発明の一態様は、カルパインが $m$ -カルパインおよび／または $\mu$ -カルパインである前記糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法に関する。

- さらに本発明の一態様は、 $m$ -カルパインおよび／または $\mu$ -カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター  
20      1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つの分解を阻害することを特徴とする糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法に関する。

- さらにまた本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子がインシュリン遺伝子またはグルコーストランスポーター2遺伝子である前記いずれかの糖代謝関連遺伝子の  
25      遺伝子産物産生促進方法に関する。

また本発明の一態様は、カルシウム濃度により糖代謝関連遺伝子の分解程度を変えることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生調節方法に関する。

さらに本発明の一態様は、カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1  $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つの分解程度を変えることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生調節方法に関する。

- 5      さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1  $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法に関する。

10

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法に関する。

- 15      さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4、ヘパトサイトヌクレアーファクター1  $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つの分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

20

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

- 25      さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1  $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれ

る少なくとも1つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2  
5 遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いるこ  
10 とを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2  
15 遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解に起因する疾患の防止方法  
20 および／または治療方法に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つの分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法  
25 および／または治療方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター 2 遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

10 さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進剤に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤に関する。

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター 2 遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる医薬組成物に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファク



ター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つの分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および  
5 /または治療剤に関する。

また本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤  
10 および／または治療剤に関する。

さらに本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター 2 遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの転写因子分解阻害剤を有効量含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤に関する。  
15

また本発明の一態様は、前記分解阻害方法を用いることを特徴とする、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法に関する。

さらに本発明の一態様は、前記分解阻害剤を用いることを特徴とする、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記分解阻害剤を有効量含んでなる、肝細胞腺腫または肝細胞癌の防止剤および／または治療剤に関する。  
20

また本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによる該転写因子切断を可能にする条件下、カルパインおよび／または該転写因子と被検化合物を接触させ、カルパインによる該転写因子の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによる該転写因子の  
25

切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

さらに本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによる該転写因子の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／または該転写因子と被検化合物を接触させ、該転写因子量または該転写因子分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによる該転写因子の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインと該転写因子の結合を可能にする条件下、カルパインおよび／または該転写因子と被検化合物を接触させ、カルパインと該転写因子の結合を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインと該転写因子の結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法に関する。

また本発明の一態様は、カルパインが、 $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインである前記いずれかの同定方法に関する。

さらに本発明の一態様は、糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つである前記いずれかの同定方法に関する。

さらにまた本発明の一態様は、前記いずれかの同定方法で同定された化合物に関する。

また本発明の一態様は、カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、カルパインにより分解される糖代謝関連遺伝子の転写因子、該転写因子をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドを

含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

- さらに本発明の一態様は、カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つ、並びにヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1およびこれらいずれかをコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キットに関する。
- さらにまた本発明の一態様は、カルパインが、m-カルパインまたは $\mu$ -カルパインである前記試薬キットに関する。

#### 図面の簡単な説明

- 第1図はm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるHNF-4 $\alpha$ （配列番号1）の切断認識部位を示す。アミノ酸配列は1文字表記し、切断認識部位は下線で示した。

第2図はm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるHNF-1 $\alpha$ （配列番号2）の切断認識部位を示す。アミノ酸配列は1文字表記し、切断認識部位は下線で示した。

- 第3図はm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインによるIPF-1（配列番号3）の切断認識部位を示す。アミノ酸配列は1文字表記し、切断認識部位は下線で示した。

- 第4図はm-カルパインとHNF-4 $\alpha$ の相互作用をインシリコで予測した結果を示す。第4図Aはヒトm-カルパインとヒトHNF-4 $\alpha$ （配列番号1）とのローカルアライメントの結果、高いスコアを示した領域を表示した。第4図Bはウサギm-カルパインとヒトHNF-4 $\alpha$ （配列番号1）とのローカルアライメントの結果、高いスコアを示した領域を表示した。アミノ酸配列は1文字表記

した。

第5図はウサギm-カルパインがインビトロでヒトHNF-4 $\alpha$ をカルシウム存在下で分解したことを説明する。第5図Aおよび第5図Bはそれぞれ、抗HNF-4 $\alpha$ 抗体および抗Xpress抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。図中の+および-は各組成の有無を示す。矢頭はHNF-4 $\alpha$ のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

第6図はヒトm-カルパインとヒトHNF-4 $\alpha$ が細胞内で結合したことを説明する。レーン1はm-カルパイン(FLAG-tag付加)とHNF-4 $\alpha$ (Xpress-tag付加)を共発現させた細胞試料、レーン2はm-カルパイン(FLAG-tag付加)のみを発現させた細胞試料である。第6図Aおよび第6図Bはそれぞれ、抗FLAG M2抗体および抗Xpress抗体を用いたウエスタンブロッティング(Blot)の結果を示す。図中、IPは抗HNF-4 $\alpha$ 抗体を用いて免疫沈降を行なったことを、lysateは免疫沈降していない細胞試料を示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

第7図はヒトm-カルパインがインビトロでヒトHNF-4 $\alpha$ をカルシウム存在下で分解したことを説明する。ヒトm-カルパインとカルパインスモールサブユニット1とを共発現させた昆虫細胞のライセートをヒトm-カルパインとして用いた。陰性対照としてカルパイン非発現の昆虫細胞ライセートおよびライセート無添加試料(図中では対照と表示。)を用い、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。図は抗HNF-4 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-4 $\alpha$ のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

第8図はヒト $\mu$ -カルパインがインビトロでヒトHNF-4 $\alpha$ をカルシウム存在下で分解したことを説明する。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。陽性対照としてウサギm-カルパインおよびラットm-カルパインを用いた。図は抗HNF-4 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-4 $\alpha$ のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカー

の分子量である。

第9図はイオノフォアの添加により細胞内でHNF-4 $\alpha$ が分解されたことを説明する。第9図Aおよび第9図Bはそれぞれ、核画分および細胞質画分におけるHNF-4 $\alpha$ の分解を示す。図は抗HNF-4 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-4 $\alpha$ の分解物のバンドを示す。図の左

5

第10図はヒト $\mu$ -カルパイン、ウサギm-カルパインおよびラットm-カルパインが、インビトロでヒトHNF-1 $\alpha$ をカルシウム存在下で分解したことを説明する。対照は、カルパイン無添加の試料を表わす。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。上図および下図はそれぞれ、抗Omni/M21抗体および抗HNF-1 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-1 $\alpha$ のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

10

第11図はヒトm-カルパインがインビトロでヒトHNF-1 $\alpha$ をカルシウム存在下で分解したことを説明する。ヒトm-カルパインとカルパインスモールサブユニット1とを共発現させた昆虫細胞のライセートをヒトm-カルパインとして用いた。陰性対照としてカルパイン非発現の昆虫細胞ライセート（図中ではコントロールsf-9細胞ライセートと表示。）およびライセート無添加試料（図中では対照と表示。）を用い、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。図は抗HNF-1 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-1 $\alpha$ のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

15

20

第12図はイオノフォアの添加により細胞内でHNF-1 $\alpha$ が分解されたことを説明する。図は抗HNF-1 $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、アスタリスク（\*）はHNF-1 $\alpha$ の分解物のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

25

第13図はヒト $\mu$ -カルパイン、ウサギm-カルパインおよびラットm-カル

パインが、インビトロでヒト I P F - 1 をカルシウム存在下で分解したことを説明する。対照は、カルパイン無添加の試料を表わす。図中の + および - はカルシウムの有無を示す。第 13 図 A および第 13 図 B はそれぞれ、抗 X p r e s s 抗体および抗 I P F - 1 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果である。矢  
5 頭およびアスタリスク (\*) はそれぞれ、I P F - 1 のバンドおよびカルパインによる I P F - 1 の分解物を示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

第 14 図はヒト m - カルパインがインビトロでヒト I P F - 1 をカルシウム存在下で分解したことを説明する。ヒト m - カルパインとカルパインスモールサブ  
10 ユニット 1 とを共発現させた昆虫細胞のライセートをヒト m - カルパインとして用いた。陰性対照としてカルパイン非発現の昆虫細胞ライセート (図中ではコントロール s f - 9 細胞ライセートと表示。) およびライセート無添加試料 (図中では対照と表示。) を用い、陽性対照としてラット m - カルパインを用いた。図中の + および - はカルシウムの有無を示している。図は抗 I P F - 1 抗体を用いたウ  
15 エスタンブロッティングの結果である。矢頭およびアスタリスク (\*) はそれぞれ、I P F - 1 のバンドおよびカルパインによる I P F - 1 の分解物を示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

第 15 図はイオノフォアの添加により細胞内で I P F - 1 が分解されたことを説明する。図は抗 I P F - 1 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であ  
20 り、アスタリスク (\*) は I P F - 1 の分解物のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明は、参照によりここに援用されるところの、日本国特許出願番号第 20  
25 02 - 254973 号、同第 2003 - 96370 号、同第 2003 - 96371 号および同第 2003 - 96372 号からの優先権を請求するものである。

本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されてい

い限り、当業者により普通に理解される意味を持つ。本明細書中では当業者に既知の種々の方法が参照されている。そのような引用されている公知の方法を開示する刊行物などの資料は、引用により、本明細書中にそれらの全体が完全に記載されているものと見なす。

- 5      以下、本発明について、発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。以下の詳細な説明は例示であり、説明のためのものに過ぎず、本発明を何ら限定するものではない。

本発明においては、 $m$ -カルパインとHNF-4 $\alpha$ が相互作用することを特許  
10      文献1記載の方法に従ってインシリコ (i n s i l i c o) で予測した。さらに実験的に、 $m$ -カルパインがHNF-4 $\alpha$ と結合すること、および $m$ -カルパインがHNF-4 $\alpha$ を分解することを初めて明らかにした。また、 $m$ -カルパインと同じくカルパインスーパーファミリーに属する $\mu$ -カルパインが同様にHNF-4 $\alpha$ を分解することを見出した。 $m$ -カルパインがHNF-4 $\alpha$ と結合して  
15      これを分解すること、および $\mu$ -カルパインがHNF-4 $\alpha$ を分解することから、 $\mu$ -カルパインもHNF-4 $\alpha$ に結合すると考えられる。

さらに、HNF-4 $\alpha$ と同様、糖代謝関連遺伝子の転写因子として作用するHNF-1 $\alpha$ およびIPF-1が $m$ -カルパインおよび $\mu$ -カルパインのいずれによっても分解されることを見出した。

- 20      カルパインによる切断認識部位のアミノ酸モチーフから、HNF-4 $\alpha$  (配列番号1) は $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインにより、下記4箇所の切断認識部位で切断されると推定した (第1図): アミノ酸配列第79番目のバリン (V) に続くアルギニン (R) とそれに続くリジン (K) との間; 第211番目のロイシン (L) に続くアルギニン (R) とそれに続くアラニン (A) との間; 第30  
25      2番目のロイシン (L) に続くアルギニン (R) とそれに続くセリン (S) との間; および第384番目のロイシン (L) に続くメチオニン (M) とそれに続くグルタミン (Q) との間。

HNF-1 $\alpha$  (配列番号2) はm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインにより、下記9箇所の切断認識部位で切断されると推定した(第2図): アミノ酸配列第162番目のロイシン(L)に続くチロシン(Y)とそれに続くトレオニン(T)との間; 第167番目のバリン(V)に続くアルギニン(R)とそれに続くリジン(K)との間; 第262番目のバリン(V)に続くアルギニン(R)とそれに続くバリン(V)との間; 第264番目のバリン(V)に続くチロシン(Y)とそれに続くアスパラギン(N)との間; 第320番目のバリン(V)に続くアルギニン(R)とそれに続くアミノ酸残基(不確定であるが、チロシンであるという報告がある)との間; 第411番目のバリン(V)に続くメチオニン(M)とそれに続くトレオニン(T)との間; 第476番目のロイシン(L)に続くメチオニン(M)とそれに続くプロリン(P)との間; 第502番目のロイシン(L)に続くチロシン(Y)とそれに続くセリン(S)との間; および第597番目のロイシン(L)に続くチロシン(Y)とそれに続くグルタミン(Q)との間。

IPF-1 (配列番号3) はm-カルパインまたは $\mu$ -カルパインにより、下記3箇所の切断認識部位で切断されると推定した(第3図): アミノ酸配列第13番目のロイシン(L)に続くチロシン(Y)とそれに続くリジン(K)との間; 第36番目のロイシン(L)に続くチロシン(Y)とそれに続くメチオニン(M)との間; および第181番目のバリン(V)に続くメチオニン(M)とそれに続くロイシン(L)との間。

本明細書においては、アミノ酸を1文字表記または3文字表記することがある。また、ペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドを意味し、オリゴマーとも称する単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドなどの短鎖ペプチド、並びに単離された若しくは合成の完全長ポリペプチドや単離された若しくは合成の完全長蛋白質などの長鎖ペプチドを包含する。

このように本発明においては、転写因子としての機能を有するHNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1が、カルパインにより分解されることを明らかに



した。HNF-4 $\alpha$ は、コレステロール、脂肪酸およびグルコースの代謝や血液凝固などの様々な機能に関与する物質をコードする種々の遺伝子発現を調節している。HNF-1 $\alpha$ は、多くの肝特異的遺伝子、例えばアルブミン、フィブリノーゲンや $\alpha$ 1アンチトリプシンなどの遺伝子発現を調節している。また、IPF-1は、GLUT2、インシュリンおよびグルコキナーゼなどの糖代謝関連遺伝子の発現を制御していることが報告されている。転写因子の分解による減少は、それが作用する遺伝子の発現を低減させ、ひいては該遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患に繋がる生体機能の異常を引き起こす。したがって、これら転写因子がそれぞれ作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および治療が、カルパインによる該転写因子の分解を阻害することにより可能になる。

HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1は、それら機能の1つにおいて、膵臓 $\beta$ 細胞における転写因子ネットワークを形成し、糖代謝関連遺伝子発現に関与していることが知られている。糖代謝関連遺伝子とは、生体において糖代謝（糖吸収、糖輸送および糖分解など）を調節している物質をコードする遺伝子のことであり、例えばインシュリン、グルコキナーゼ、GLUT2などが挙げられる。これら糖代謝関連遺伝子の発現に係わる転写因子の減少や機能欠損は、膵臓 $\beta$ 細胞において転写因子ネットワークの破綻を招き、その結果糖代謝異常を引き起こして糖尿病などの疾患の原因になると考えられる。

糖代謝関連遺伝子の転写因子の減少や機能欠損の原因の1つとして、例えばその分解が挙げられる。糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を阻害することにより、該転写因子の減少や機能欠損に起因する疾患、あるいは該転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。

これら知見により達成した本発明の1態様は、カルパインを用いることを特徴とする糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解方法および分解剤に関する。

糖代謝関連遺伝子の発現に係わる転写因子としては、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1が例示できる。本発明に係る分解方法を適用し得る糖代謝関連遺伝子の転写因子はこれら具体例に限らず、カルパインにより分解されるも

のである限りにおいて、何れにも適用可能である。カルパインによる分解の検出は、カルパインと転写因子とをカルシウム存在下で接触させた後にウェスタンブロット法などの公知方法を使用して実施可能である。

カルパインはカルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼを全て包含する。カルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼとしては、 $m$ -カルパイン、 $\mu$ -カルパイン、カルパイン3、カルパイン5、カルパイン8、カルパイン9、カルパイン10、カルパイン11、カルパイン12およびカルパイン13などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインである。 $\mu$ -カルパインは $m$ -カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、より低濃度のカルシウムで活性化される。そのため、 $\mu$ -カルパインは $m$ -カルパインと比較してカルシウム濃度上昇により活性化され易く、生体内で主に作用している可能性が考えられることから、より好ましくは $\mu$ -カルパインである。これら各プロテアーゼを使用するときは、これらを単独で用いてもよいし、2つ以上を組合せて用いることもできる。またカルパインは、1種類の蛋白質を特異的に分解するものに限らず、複数の蛋白質、例えば複数の転写因子の分解に関与するものであってもよい。

本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解剤は、カルパインをその活性成分として有効量含んでなる。

本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解方法は、カルパインと該転写因子を共存させることを特徴とする。

カルパインはカルシウム依存性プロテアーゼであるため、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子の共存はカルシウム存在下で行なうことが好ましい。カルシウム濃度は、カルパインのカルシウム要求性を考慮し、カルパインを活性化してそれらの酵素活性を誘発できる濃度を用いる。例えば、 $m$ -カルパインを活性化するためには、好ましくは約1 mM以上のカルシウム濃度が好適である。 $\mu$ -カルパインを活性化するためには、好ましくは約10  $\mu$ M以上、より好ましくは約20  $\mu$ M以上、さらに好ましくは約30  $\mu$ M以上のカルシウム濃度が好適であ

る。また、カルパインによるHNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1の分解はカルシウム依存性であったことから、カルシウム濃度を調節することによりカルパインによるこれら糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を所望の程度に調節することができる。かかるカルシウム濃度の調節を特徴とする糖代謝関連遺伝子の

5 転写因子の分解方法も本発明の範囲に包含される。また、カルパインと転写因子の1つまたは2つ以上とを少なくとも含んでなり、カルパインと該転写因子とを共存させることを特徴とする該転写因子の分解系の構築およびその利用も、本発明において可能である。

糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解方法および分解系は、インビトロのものであってもよく、インビボのものであってもよい。より具体的には、カルパインと転写因子を、例えば試験管内やマルチウエルプレート内で、カルシウムの存在下で共存させて分解させる分解方法および分解系が例示できる。あるいは、カルパインと転写因子を共発現させた細胞を用いた分解方法および分解系を例示できる。発現に用いる細胞は、蛋白質の発現のために一般的に使用されている細胞を使用

10 可能である。これら蛋白質の発現は、公知の遺伝子工学的手法を用いて実現することができる。かかる細胞を用いた分解方法および分解系において、細胞内カルシウム濃度を調節する、例えばカルパインが活性化する濃度に調節するためには、イオノフォアの使用が好適である。イオノフォアは、A23187など公知のものを用いることができる。また、非ヒト動物にカルパインをコードする遺伝子、

15 さらに糖代謝関連遺伝子の転写因子をコードする各遺伝子を自体公知の遺伝子工学的手法を用いて導入することにより、非ヒト動物における該転写因子の分解方法および分解系を提供することが可能である。

本発明において使用するカルパインおよび糖代謝関連遺伝子の転写因子は、これらの1つまたは2つ以上を遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成

25 産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってもよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、これら蛋白質は、それらのN末端側やC末端側に別の蛋白質やペプチドなどを、直接的にまたはリンカ

ーペプチドなどを介して間接的に、遺伝子工学的的手法などを用いて付加することにより標識化したものであってもよい。好ましくは、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子との相互作用およびこれら蛋白質の機能、例えばカルパインと該転写因子の接触、カルパインの酵素活性および転写因子の機能などが阻害されないような標識化が望ましい。標識物質としては、例えば酵素類（グルタチオン S-トランスフェラーゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼなど）、タグペプチド類（His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはExpress-tagなど）、蛍光蛋白質類〔グリーン蛍光蛋白質、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate）またはフィコエリスリン（phycoerythrin）など〕、マルトース結合蛋白質、免疫グロブリンのFc断片、またはビオチンなどが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは放射性同位元素による標識も可能である。標識化するとき、1種類の標識物質を付加してもよいし複数を組合せて付加することもできる。これら標識物質自体またはその機能を測定することにより、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を検出することが可能である。遺伝子導入に用いるカルパインおよび転写因子をそれぞれコードする遺伝子は、ヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的的手法により調製することができる。これら遺伝子を適当な発現ベクターDNA、例えば細菌プラスミド由来のベクターなどに自体公知の遺伝子工学的的手法で導入し、上記各遺伝子を含むベクターを得て、遺伝子導入に利用することができる。遺伝子導入は、自体公知の遺伝子工学的的手法を用いて実施可能である。

糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解剤、分解方法および分解系は、該転写因子の機能解明や該転写因子が関与する転写因子ネットワークについての研究、および該転写因子の分解に起因する疾患、例えば糖尿病における該転写因子やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。また、当該分解方法および分解系を用いて、当該転写因子の分解を阻害する化合物の同定方法を構

築することも可能である。

本発明の別の 1 態様は、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害剤および阻害方法に関する。当該阻害剤および阻害方法は、カルパイン活性を阻害すること、またはカルパインによる当該転写因子の切断を阻害すること、あるいはカルパインと当該転写因子の結合を阻害することを特徴とする。

カルパイン活性の阻害またはカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子切断の阻害は例えば、カルパインの酵素活性を阻害することにより実施できる。本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害剤は、1 態様において、カルパイン活性を阻害する物質の少なくとも 1 つを活性成分として有効量含んでなる。

また、本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害方法は、1 態様において、カルパイン活性を阻害する物質の少なくとも 1 つを用いることを特徴とする。本発明に係る阻害剤および阻害方法を適用する対象物としては、少なくともカルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを含む対象物、例えば少なくともこれらを含む生体外試料が挙げられる。転写因子としては、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ および IPF-1 が好ましく例示でき、これらのうち少なくとも 1 つとカルパインとを含む生体外試料が対象物としてより好ましい。また、少なくともカルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを発現している細胞、例えば膵臓 $\beta$ 細胞など、並びにかかる細胞を担持している哺乳動物なども当該対象物に含まれる。

カルパイン活性を阻害する効果を有する物質としては、拮抗阻害効果を有するペプチド類、抗体および低分子化合物などが例示できる。具体的には、カルパインインヒビターとして知られている N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Cl または Z-Val-Phe-CHO などが例示できる。抗体としては、カルパインまたは糖代謝関連遺伝子の転写因子を認識して結合する抗体であって、カルパインによる該転写因子の分解を阻害する抗体が挙げられる。かかる抗体として

さらに好ましくは、当該転写因子の機能、例えば転写因子活性を阻害しないものが好適である。抗体は、カルパインまたは当該転写因子自体、これら由来の部分ペプチド、あるいはこれらが相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。低分子化合物としては、カルパインの酵素活性を阻害する化合物、好ましくは該酵素活性を特異的に阻害する化合物が挙げられる。かかる化合物は、例えば、本発明に係る分解方法または分解系を利用して、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を阻害するものを同定することにより得ることができる。カルパインを特異的に阻害するとは、カルパインを強く阻害するが、他の酵素は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子切断の阻害はまた、カルパインと該転写因子との結合を阻害することにより実施できる。本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子分解の阻害剤は、1態様において、カルパインと該転写因子との結合を阻害する物質の少なくとも1つを活性成分として有効量含んでなる。

本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子分解の阻害方法は、1態様において、カルパインと該転写因子との結合を阻害する物質の少なくとも1つを用いることを特徴とする。カルパインと当該転写因子との結合の阻害は、例えば両蛋白質が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて実施可能である。かかるペプチドとして、当該転写因子のアミノ酸配列においてカルパインにより切断される部位、すなわち切断部認識位のアミノ酸配列を含むペプチドが例示できる。例えば、 $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインの切断認識部位のアミノ酸配列は、LY、LM、LR、VY、VMまたはVRであると考えられる。このような切断認識部位のアミノ酸配列を少なくとも1つ含むペプチドが好ましい。かかるペプチドは、カルパインによる当該転写因子分解を競合的に阻害すると考えられる。より好ましくは、当該転写因子のアミノ酸配列、例えば配列番号1、配列番号2または配列番号3に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり、且つカルパインの切断認識部位のアミノ酸配列を含むペプチ

ドが挙げられる。

カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子との結合の阻害はまた、カルパインと該転写因子の結合部位のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて実施可能である。具体的には、m-カルパインの基質となるHNF-4 $\alpha$ 由来のかかるペプチド、例えばペプチドYKLLPG（配列番号5、実施例1および第4図を参照）  
5 または該ペプチドを含むペプチドは、両蛋白質の相互作用を競合的に阻害すると考えられる。

上記ペプチドは、カルパインまたは糖代謝関連遺伝子の転写因子のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、カルパイン  
10 による該転写因子の切断および／またはカルパインと該転写因子の結合を阻害するものを選択することにより得ることができる。

このように特定されたペプチドに1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入などの変異を導入したものも、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子の結合を阻害する限りにおいて、本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したペプチドは、さらにカルパインによる当該転写因子の切断を阻害するものが好ましい。変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、  
15 また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入などの変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術（非特許文献41）を利用できる。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質（物  
20 性、機能または免疫学的活性など）を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸など）の間での相互置換は容易に想定される。

カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子との結合を阻害し得るペプチドは、  
25 その構成アミノ基またはカルボキシル基などを、例えばアミド化修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。特に、ペプチドと他の蛋白質との結合を安定化し、ペプチドを解離し難くするために通常よく使用される

修飾、例えばC末端のアルデヒド化またはN末端のアセチル化などの修飾は、カルパインと当該転写因子の結合を阻害するペプチドの有効性を高めるために有用である。

上記ペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。

- 5 例えば、公知文献に記載の方法（非特許文献42および非特許文献43）が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。

本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害剤は、その1態様において、該転写因子とカルパインとの結合阻害物質、該転写因子のカルパインによる切断阻害物質、およびカルパイン活性阻害物質の少なくとも1つを活性成分として有効量含有してなる。このとき、当該転写因子分解の阻害剤は、1種類の転写因子とカルパインとの結合阻害物質、該転写因子のカルパインによる切断阻害物質、およびカルパイン活性阻害物質の少なくとも1つを活性成分として有効量含有してなる阻害剤であることができる。また、各転写因子に対するかかる阻害物質を複数組合せて含有する阻害剤であることもできる。より具体的には、例えば

10 HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ またはIPF-1 $\alpha$ とカルパインとの結合阻害物質、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ またはIPF-1 $\alpha$ のカルパインによる切断阻害物質、カルパイン活性阻害物質の少なくとも1つを活性成分として有効量含有してなることが好ましい。

本発明に係る糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害方法は、その1態様において、該転写因子とカルパインとの結合阻害物質、該転写因子のカルパインによる切断阻害物質、およびカルパイン活性阻害物質の少なくとも1つを用いることを特徴とする。このとき、当該転写因子分解の阻害方法においては、1種類の転写因子とカルパインとの結合阻害物質、該転写因子のカルパインによる切断阻害物質、およびカルパイン活性阻害物質の少なくとも1つを用いることができ、また、各転写因子に対するかかる阻害物質を複数組合せて用いることもできる。より具体的には、例えばHNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ またはIPF-1 $\alpha$ とカルパインとの結合阻害物質、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ またはIPF-1 $\alpha$ のカル

20

25



パインによる切断阻害物質、カルパイン活性阻害物質の少なくとも1つを用いることが好ましい。

本発明のまた別の1態様は、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法に関する。本発明に係る糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法は、それら  
5 をコードする遺伝子の発現に係る転写因子のカルパインによる分解を調節して、該遺伝子の遺伝子産物の産生を調節することを特徴とする。

糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生調節方法の1態様は、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法であり、該遺伝子発現に係る転写因子のカルパインによる分解を阻害することを特徴とする。当該産生促進方法は具体的には、当該転写  
10 因子の分解阻害剤または当該転写因子の分解阻害方法を使用することにより達成できる。上記分解阻害剤を含んでなる、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進剤も本発明の範囲に包含される。

糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生調節方法の別の1態様としては、カルシウム濃度を調節して該因子の発現に係る転写因子の分解程度を所望の程度に調節することにより、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生を調節する方法が挙げられる。  
15 カルシウム濃度を高濃度にしてカルパインを活性化させることにより糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子を分解することができるため、該転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物の産生を低下させることができる。カルシウム濃度を低濃度にしてカルパインの酵素活性を減弱させることにより、該転写因子の分解を阻害  
20 することができるため、当該遺伝子産物の産生を促進することができる。

糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物としては、例えば、該転写因子の結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内に有する遺伝子の遺伝子産物が挙げられる。具体的には、HNF-4 $\alpha$ が作用する遺伝子として、HNF-4 $\alpha$ 結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内に有する遺  
25 伝子、例えばインシュリン遺伝子、HNF-1 $\alpha$ 遺伝子、血液凝固第V因子遺伝子、および血液凝固第IX因子遺伝子などが挙げられる。HNF-1 $\alpha$ が作用する遺伝子として、HNF-1 $\alpha$ 結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内

に有する遺伝子、例えば、インシュリン遺伝子、GLUT 2 遺伝子、HNF-4  $\alpha$  遺伝子および IPF-1 遺伝子などが挙げられる。IPF-1 が作用する遺伝子として、IPF-1 結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内に有する遺伝子、例えば、GLUT 2 遺伝子などが挙げられる。

5      本発明のさらに別の 1 態様は、糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法に関する。当該疾患の防止剤および／または治療剤は、上記分解阻害剤を含んでなる。当該疾患の防止方法および／または治療方法は、上記分解阻害剤または上記分解阻害方法を使用することにより達成できる。

10      糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子の分解に起因する疾患としては、例えば該転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患が挙げられる。例えば HNF-4  $\alpha$  はインシュリン遺伝子に作用し該遺伝子の遺伝子産物産生に寄与している。HNF-1  $\alpha$  はインシュリン遺伝子および GLUT 2 遺伝子に作用し、これら遺伝子の遺伝子産物産生に寄与している。また、HNF-1  $\alpha$  と HNF-4  $\alpha$  は互いの遺伝子に転写因子として作用し、その遺伝子産物産生を促進することにより、さらにインシュリン遺伝子の遺伝子産物産生に寄与している。また、IPF-1 は、GLUT 2 遺伝子に作用し遺伝子の遺伝子産物産生に寄与している。また、IPF-1 は HNF-4  $\alpha$  に転写因子として作用してその発現を促進するため、HNF-4  $\alpha$  の産生促進を介してインシュリン遺伝子の遺伝子産物産生に寄与している。

糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子の分解に起因する疾患として具体的には、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、例えばインシュリンや GLUT 2 の減少に起因する疾患などが例示できる。より具体的には、糖代謝異常による疾患、例えば糖尿病などが挙げられる。

25      実際、マウスの膵臓ランゲルハンス島にカルパイン阻害剤を暴露させるとグルコース刺激によるインシュリン分泌が増加することが報告されている（非特許文献 15）。しかし、この報告においては、カルパインと糖代謝関連遺伝子発現に係

る転写因子との関連については開示されていない。また、膵島においては、高血糖状態が持続すると細胞内カルシウム濃度が上昇し、グルコース刺激性インシュリン分泌の脱感作が起こる（非特許文献44）。

5 本発明における知見とこれら情報から、長期の高血糖による細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルパインが活性化され、その結果糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子が分解されるために、膵臓β細胞での転写因子ネットワークが破綻して糖代謝の異常が起き、ひいては2型糖尿病と同様の病態が誘発されるというカスケードが存在すると考えられる。

したがって本発明によれば、上記カスケードにおいてカルパインによる糖代謝  
10 関連遺伝子発現に係る転写因子の分解を阻害できるため、糖代謝の正常化を図り、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、例えば糖尿病を防止および／または治療可能である。

HNF-4αは、糖代謝関連遺伝子以外の遺伝子にも転写因子として作用することが知られている。例えば、HNF-4α結合部位が血液凝固第VII因子遺  
15 伝子または第IX因子遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー部位に存在することが知られている。このことから、これら各遺伝子の遺伝子産物欠乏に起因する出血性疾患、例えば血友病や重症第VII因子欠損症がHNF-4α分解により引き起こされることが考えられ、これら疾患の防止および／または治療に本発明に係る分解阻害剤または分解阻害方法が有用である。

20 HNF-1αは、その不活化が肝細胞腺腫の原因となることが報告されている（非特許文献34）。このことから、肝細胞腺腫ひいてはそれが形質転換した肝細胞癌がHNF-1α分解により引き起こされることが考えられ、これら疾患の防止および／または治療に本発明に係る分解阻害剤または分解阻害方法が有用である。

本発明のまた別の1態様は、カルパインによる糖代謝関連遺伝子発現に係る  
25 転写因子の分解を阻害する化合物の同定方法に関する。該同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。また、本発明に係る分解系または分解方法を利用して、該同定方法を実施可能である。被検化合物と

しては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはカルパインおよび糖代謝関連遺伝子の転写因子の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。あるいは、当該転写因子のカルパインによる切断認識部位のペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物なども被検化合物として好適である。

具体的には、カルパインによる糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子の切断を可能にする条件を選択し、当該条件下でカルパインおよび／または該転写因子と被検化合物を接触させ、該転写因子の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカースを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカースの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、カルパインによる該転写因子の分解を阻害する化合物を同定できる。カルパインによる転写因子の切断を可能にする条件としては、例えばカルパインを活性化する濃度のカルシウムの存在下であることが挙げられる。また、該条件はインビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、カルパインと当該転写因子を共発現させた細胞を用いることもできる。カルパインおよび／または当該転写因子と被検化合物の接触は、カルパインによる当該転写因子の分解反応の前に行なってもよいし、分解反応に共存させることにより行なってもよい。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカースとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、および放射性同位体など、マーカースとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子など、または検出用のエピトープタグ、例えば6×His-tagなど、一般的に化合物の同定方法に用いられている標識物質であれば、いずれを用いることもできる。これらシグナルまたはマーカースは、単独で使用してもよく、2つ以上を組合せて用いてもよい。これらシグナルまたはマーカースの検出方法は当業者には周知のものである。簡便には、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解は、該転写因子または該転写因子分解物量の存在若し

くは不存在および／または変化の測定により検出できる。当該転写因子量または当該転写因子分解物量の定量は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法などを用いて実施できる。あるいは、当該転写因子の分解の検出は、当該転写因子活性の存在若しくは不存在および／または

5 変化の測定により行なうことができる。具体的には、例えば、インシュリン遺伝子に作用する転写因子であるときには、該転写因子とカルパインとを発現している細胞に、インシュリン遺伝子のプロモーター領域をその上流に組み込んだレポーター遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションし、被検化合物とこの細胞を接触させた場合のレポーター遺伝子の発現量を、当該被検化合物と接触させ

10 なかった場合のレポーター遺伝子の発現量と比較することにより、所望の化合物の同定を行なうことができる。GLUT 2 遺伝子に作用する転写因子であるときには、該転写因子とカルパインとを発現している細胞に、GLUT 2 遺伝子のプロモーター領域をその上流に組み込んだレポーター遺伝子を含むプラスミドをトランスフェクションし、同様に化合物の同定を実施できる。これら具体例に限らず、カルパインにより分解される転写因子が作用する遺伝子のプロモーター領域

15 を組み込んだレポーター遺伝子を用いて、化合物の同定が可能である。

その他、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子の結合を可能にする条件を選択し、当該条件下でカルパインおよび／または転写因子と被検化合物を接触させ、カルパインと該転写因子の結合を検出するシグナルおよび／またはマーカー

20 を使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、カルパインによる該転写因子の分解を阻害する化合物を同定できる。カルパインと当該転写因子の結合の検出は、自体公知の検出方法、例えばウェスタンブロッティング法などを用いて実施できる。

かかる同定方法で得られた化合物は、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害

25 剤あるいは該転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物産生促進剤として利用可能である。当該転写因子の分解阻害剤または該転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物産生促進剤は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することに

より、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これら阻害剤および促進剤は、単独で使用することもできるし、複数を組合せて使用することも可能である。

本発明に係る医薬組成物は、通常は1種または2種以上の医薬用担体を用いて製造することが好ましい。医薬用担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤や賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤などを適宜使用して調製することもできる。

本発明に係る医薬組成物は、糖代謝関連遺伝子発現に係る転写因子の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤として使用することができる。また、当該疾患の防止方法および／または治療方法に使用することができる。

医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無など）、および担当医師の判断などに応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01 $\mu$ g乃至100mg程度、好ましくは約0.1 $\mu$ g～1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いて用量を変更することができる。上記投与量は1日1～数回に分けて投与すること

ができ、数日または数週間に1回の割合で間欠的に投与してもよい。

本発明に係る医薬組成物を投与するときには、該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

- 投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択することができる。この
- 5 場合、疾患、症状などに応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与のほか、皮下、皮内、筋肉内などへの投与を挙げることができる。あるいは経口による投与も可能である。さらに、経粘膜投与または経皮投与も可能である。腫瘍疾患に用いる場合は、腫瘍に注射などにより直接投与することが好ましい。
- 10 投与形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤などの固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリンなどの包接体、シロップ、エリキシルなどの液剤投与形態が含まれる。これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、
- 15 注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などに分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

- 散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグ
- 20 ネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体を用いられる。

- 懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、P
- 25 E Gなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

- 5 脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型など）を用いて、乳化・均質化处理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、
- 10 乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

- シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使
- 15 用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型）を適宜選択すればよい。

- 本発明のさらに別の1態様は、カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチド、カルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、糖代謝関連遺伝子発現に関与する転写因子、該転
- 20 写因子をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。試薬キットに含まれる転写因子としては好ましくは、HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$ およびIPF-1が例示できる。当該転写因子は複数種類を組合せて試薬キットに含有させることもできる。当該試薬キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用可能である。
- 25

また、上記ペプチドおよび上記同定方法で得られた化合物からなる試薬およびこれらを含む試薬キットも本発明の範囲に包含される。



試薬キットは、カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、これらの検出剤、反応希釈液、緩衝液、洗浄剤および反応停止液など、測定の実施に必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んでもよい。

- 5 製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

これら試薬および試薬キットは、例えば糖代謝関連遺伝子の転写因子ネットワークについての研究および該転写因子の機能不全や分解に起因する疾患、例えば

- 10 糖尿病における該転写因子やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。

### 実施例

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

15 実施例 1

(m-カルパインと相互作用する蛋白質のインシリコでの探索)

- 20 m-カルパインと相互作用する蛋白質を、特許文献 1 記載の方法に従って予測した。まず、m-カルパインのアミノ酸配列をある長さのペプチドに分解し、各ペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索した。ついで、得られた蛋白質とm-カルパインとの間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをm-カルパインと相互作用すると予測した。

- 25 解析の結果、m-カルパイン由来の 6 アミノ酸残基からなるペプチド F K L P P G (配列番号 4) と相同性のあるペプチド Y K L L P G (配列番号 5) が、肝遺伝子の発現を制御することが知られている核転写因子の一つである H N F - 4  $\alpha$  のアミノ酸配列中に存在することが分かった (第 4 図 A および B)。第 4 図 A はヒト m-カルパインとヒト H N F - 4  $\alpha$  とのローカルアライメントの結果を、第

4 図Bはウサギm-カルパインとヒトHNF-4 $\alpha$ とのローカルアライメントの結果を示す。ここにおいて、アミノ酸配列は1文字表記するものである。この結果から、HNF-4 $\alpha$ はm-カルパインと相互作用する蛋白質であると予測された。なお、ウサギm-カルパインについてNCBIデータベースに登録された配  
5 列情報には、ヒトm-カルパインの279番目のアミノ酸残基以降の配列に相当する領域しか記載がないが、この領域での同一性は94%であることから、278番目以前のアミノ酸配列についてもウサギm-カルパインはヒトm-カルパインとほぼ同等と考えられる。

## 実施例 2

### 10 (ウサギm-カルパインによるヒトHNF-4 $\alpha$ の分解)

HNF-4 $\alpha$ のm-カルパインによる分解を、ウサギm-カルパインを用いたインビトロ分解試験で検討した。

#### <材料>

HNF-4 $\alpha$ 発現プラスミドを以下のように構築した。まず、ヒトHNF-4  
15  $\alpha$  cDNAを、ヒト脳poly A<sup>+</sup>RNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により獲得した。PCRエラーと思われる塩基置換はQuick Change Site-Directed Mutagenesis kit (STRATAGENE社)により修正した。その後、N末端にHis-tagおよびXpress-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミドpcDNA3.  
20 1/His (Invitrogen社)にEcoRIサイトで組込み、HNF-4 $\alpha$ 発現プラスミドを構築した。クローニングしたHNF-4 $\alpha$  cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号XP\_009514 (登録遺伝子名はHNF4A。)と同一であった。なお、アクセッション番号XP\_009514は、2003年よりSwiss-Protデータベースのアクセッション番号P41235に変更されている。  
25

HNF-4 $\alpha$ 発現プラスミドを用い、インビトロでのHNF-4 $\alpha$ 蛋白質の合成を、TNT T7 Quick Coupled Transcription

n/Translation System (Promega 社) を使用して行なった。すなわち、HNF-4 $\alpha$  発現プラスミドと TNT T7 Quick Master Mix を混合し、メチオニン存在下で 30℃ にて 1.5 時間インキュベーションして HNF-4 $\alpha$  を合成した。

## 5 <方法>

インビトロにおける蛋白質分解試験は、合成した HNF-4 $\alpha$  にウサギの筋肉より抽出した m-カルパイン (PROTEASE, Calcium Activated Neutral, calpain, Sigma 社) を最終濃度 50  $\mu$ g/mL となるように添加し、200 mM Tris-HCl (pH 7.8) / 1 mM ジチオスレイトール (DTT) / 6 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で 37℃ にて 1 時間インキュベーションすることにより行なった。また、カルシウム非存在下での分解試験を行なうために、6 mM CaCl<sub>2</sub> の代わりに 10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加した試料を作製して同様にインキュベーションした。インキュベーション後の試料は、等容量の 2×ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファー [4% SDS / 125 mM Tris-HCl, pH 6.8 / 20% グリセロール / 0.01% ブロムフェノールブルー (BPB) / 10%  $\beta$ -メルカプトエタノール (mercaptoethanol)] を加えて 5 分間加熱し、10% SDS-PAGE により分離した。その後、抗 HNF-4 $\alpha$  抗体 / HNF-4 $\alpha$  (C-19) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) および抗 Xpress 抗体 (Invitrogen 社) を用いてウェスタンブロッティング法により HNF-4 $\alpha$  を検出した。検出は ECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech 社) を使用して行なった。

## 25 <結果>

第 5 図 A および B に示したように、ウサギ m-カルパインによる HNF-4 $\alpha$  の分解が認められた。一方、HNF-4 $\alpha$  はカルシウム非存在下または m-カル

パイン無添加では分解されなかった。ウサギm-カルパインとヒトm-カルパインは約94%の高い相同性を有することから、ヒトm-カルパインも同様にHNF-4 $\alpha$ を分解すると考えられる。以上の結果から、HNF-4 $\alpha$ はm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

### 5 実施例 3

(ヒトm-カルパインとヒトHNF-4 $\alpha$ の結合解析)

m-カルパインとHNF-4 $\alpha$ の結合を、細胞内共発現/免疫沈降法による結合試験により検討した。

<材料>

- 10 m-カルパイン発現プラスミドの構築は以下のように行なった。まず、カルパイン cDNAを、ヒト肝polyA<sup>+</sup>RNA (Clontech社) からRT-PCRにより獲得した。PCRエラーと思われる塩基置換はQuickChange Site-Directed Mutagenesis kitにより修正した。その後、C末端にFLAG-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミド、pCMV-Tag4 (STARATAGENE社) へSal-Iサイトで組込み、m-カルパイン発現プラスミドを構築した。クローニングしたm-カルパイン cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセシオン番号AAA35645 (登録遺伝子名はCAPN2。) と、73番目および74番目のアミノ酸がメチオニン-アルギニン (MR) からイソロイシン-グルタミン酸 (IE) に置換されている以外は同一であった。このIEへの置換はSwiss-Prot (P17655) においてコンフリクト (Conflict) の記載がある。
- 15
- 20

ヒトHNF-4 $\alpha$ 発現プラスミドは、実施例2で調製したものを用いた。

<方法>

- 25 まず、m-カルパイン遺伝子とHNF-4 $\alpha$ 遺伝子をHEK293T細胞に共遺伝子導入した。具体的には、細胞数 $1.3 \times 10^6$ のHEK293T細胞を37℃にて5%CO<sub>2</sub>の存在下で4時間培養した後 (直径60mmシャーレ)、5 $\mu$

gのHNF-4 $\alpha$ 発現プラスミドまたは陰性対照としてp cDNA3.1/Hisプラスミドを5 $\mu$ gのm-カルパイン発現プラスミドと共に、FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche社)を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、冷却したリン酸緩衝生理食塩水(一)〔以下、PBS(一)と称する。〕で細胞を洗浄し、500 $\mu$ lの細胞溶解バッファー〔20mM HEPES, pH7.5/150mM NaCl/1mM EDTA/1% Triton X-100/1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)〕に懸濁し、氷上で20分間放置した。その後、4℃にて15,000rpmで20分間遠心処理し、その上清を回収して細胞ライセート(cell lysate)とした。次に、採取したライセートに、0.1%の牛血清アルブミンを含むTBS(pH8.0)で前処理したProtein G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech社)を18 $\mu$ l添加し、4℃にて2時間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に抗HNF-4 $\alpha$ 抗体/HNF-4 $\alpha$ (C-19)抗体を0.6 $\mu$ g添加し、4℃で1時間転倒混和後、Protein G Sepharose 4 Fast Flowを20 $\mu$ l加え、さらに4℃で1時間転倒混和した。その後、遠心処理によりProtein G Sepharoseを回収し、500 $\mu$ lの洗浄バッファー〔50mM Tris-HCl, pH7.5/150mM NaCl/0.2% ノニデットP-40(Nonidet P-40)〕で3回洗浄した後、30 $\mu$ lの2 $\times$ SDS サンプルバッファーを加えて5分間加熱後、上清を10% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗FLAG M2抗体(Sigma社)および抗Xpress抗体を用いてウェスタンブロッティング法により結合した蛋白質を検出した。検出はECL western blotting detection kitを使用し、  
5  
10  
15  
20  
25  
て行なった。

#### <結果>

第6図Aに示したように、抗HNF-4 $\alpha$ 抗体による免疫沈降(図中IPと表

示)において、m-カルパイン (FLAG-tag 付加) は、HNF-4 $\alpha$  (Xpress-tag 付加) と共発現させた試料 (図中レーン1) でのみ共沈した。HNF-4 $\alpha$  非発現細胞ではm-カルパインの共沈降は認められなかった。このことから、この共沈降はアガロースビーズへの非特異的結合によるものではなく、

5 HNF-4 $\alpha$  とm-カルパインの結合を示すものであることが明らかになった。両試料におけるm-カルパインの発現が同程度であることは、抗FLAG M2 抗体によるウェスタンブロッティングの結果により確認した (第6図Aのlysate 参照)。また、細胞内のXpress-HNF-4 $\alpha$  が抗HNF-4 $\alpha$  抗体により回収されることは、第6図Bに示した結果から確認できた。

#### 10 実施例 4

(ヒトm-カルパインによるHNF-4 $\alpha$  の分解)

ヒトm-カルパインによるヒトHNF-4 $\alpha$  の分解について検討するために、ヒトm-カルパイン発現昆虫細胞ライセートを用いてインビトロ分解試験を実施した。

#### 15 <材料>

ヒトHNF-4 $\alpha$  は、実施例2と同様の方法で、HNF-4 $\alpha$  発現プラスミドを用いて作製したものを用いた。

ヒトm-カルパインは、昆虫細胞で発現させたものを用いた。まず、ヒトm-カルパイン cDNA を実施例3と同様に調製した。また、カルパインスモールサブユニット1 cDNA (calpain small subunit 1 cDNA) をヒト骨格筋cDNA (Clontech社) からPCRにより獲得し、シーケンスにより配列を確認した。カルパインスモールサブユニット1 cDNA のアミノ酸翻訳配列は、NCBI データベースのアクセッション番号NP\_001740 (登録遺伝子名はCAPNS1。) と同一であった。蛋白質発現は

20 バキュロウィルスを用いた昆虫細胞 (夜盗蛾 sf-9 細胞) 発現系にて行なった。すなわち、各々のcDNA を pFastBac DUAL プラスミド (Invitrogen社) に組み込み、Bac-to-Bac Baculovirus E

x p r e s s i o n   S y s t e m s ( I n v i t r o g e n 社) を用いて、s  
f - 9 細胞にm-カルパインおよびカルパインスモールサブユニット1を共発現  
させた。これら蛋白質を発現させたs f - 9 細胞は、冷却したP B S ( - ) で洗  
浄後、凍結融解により破碎した。ついで、2 0 m M   T r i s - H C l ( p H 7 .

5   5 ) / 5 m M   E D T A / 1 0 m M    $\beta$ -メルカプトエタノールを添加し、氷中  
で超音波処理した後に遠心処理 ( 1 5 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間) し、その上清  
を活性体試料 ( 細胞ライセートと称する。) とした。また、蛋白質非発現s f - 9  
細胞のライセートを同様に調製し、陰性対照として使用した。ライセートのm-  
カルパイン活性の有無は、基質としてカゼインを用いて確認した ( 非特許文献 4  
10   5 ) 。また、陽性対照としてラットm-カルパイン ( C a l p a i n   2 , r a t  
r e c o m b i n a n t 、 E . c o l i 、 C a l b i o c h e m 社) を用いた。

#### <方法>

インビトロ蛋白質分解試験は、H N F - 4  $\alpha$  にm-カルパイン、ラットm-カ  
ルパインまたはカルパイン非発現s f - 9 細胞ライセートを添加し、2 0 0 m M  
15   T r i s - H C l ( p H 7 . 8 ) / 1 m M   D T T / 6 m M   C a C l <sub>2</sub> 存在下  
で3 7 °Cにて1 時間インキュベーションすることにより行なった。ヒトm-カル  
パインの反応系での最終濃度は、蛋白質を発現させたs f - 9 細胞ライセートの  
蛋白質濃度で2 . 3 3 m g / m L とした。ラットm-カルパインの反応系での最  
終濃度は5 9 u n i t / m L とした。さらに、カルパイン無添加の条件下で、上  
20   記同様に分解試験を行なった。また、カルシウム非存在下条件として6 m M   C  
a C l <sub>2</sub> の代わりに1 0 m M   E D T A を添加した試料を作成し、該試料につい  
て同様に分解試験を行なった。インキュベーション後の試料は、等容量の2  $\times$  S  
D S   サンプルバッファーを加え5 分間加熱し、5 - 2 0 %   S D S - P A G E  
により分離した。その後、抗H N F - 4  $\alpha$  抗体 / H N F - 4  $\alpha$  ( C - 1 9 ) 抗体  
25   を用いたウェスタンブロッティングによりH N F - 4  $\alpha$  を検出した。検出はE C  
L   w e s t e r n   b l o t t i n g   d e t e c t i o n   k i t を使用し  
た。

### <結果>

第7図に示すように、ヒトm-カルパインによるヒトHNF-4 $\alpha$ の分解が認められた。一方、カルシウム非存在下、非発現sf-9細胞ライセートおよびカルパイン無添加ではいずれもHNF-4 $\alpha$ の分解が認められなかった。これらから、HNF-4 $\alpha$ はヒトm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

### 実施例 5

(ヒト $\mu$ -カルパインによるHNF-4 $\alpha$ の分解)

ヒト $\mu$ -カルパインによるヒトHNF-4 $\alpha$ の分解試験を、ヒト $\mu$ -カルパインを用いてインビトロで実施した。

### <材料>

HNF-4 $\alpha$ 蛋白質は、実施例2と同様の方法で、HNF-4 $\alpha$ 発現プラスミドを用いて調製したものを用いた。

$\mu$ -カルパインは、ヒト赤血球より抽出したもの(Calpain 1、ヒトerythrocytes、Calbiochem社)を用いた。

### <方法>

インビトロ蛋白質分解試験は、HNF-4 $\alpha$ に $\mu$ -カルパインを最終濃度50 unit/mLとなるように添加し、200mM Tris-HCl (pH 7.8) / 1mM DTT / 6mM CaCl<sub>2</sub>存在下で37℃にて1時間インキュベーションすることにより行なった。対照実験としてウサギm-カルパイン(実施例2参照)を最終蛋白質濃度50  $\mu$ g/mL、またはラットm-カルパイン(実施例4参照)を最終濃度59 unit/mLとなるように添加し、上記同様の条件下でインキュベーションした。また、カルシウム非存在下条件として6mM CaCl<sub>2</sub>の代わりに10mM EDTAを添加した試料を作成し、該試料について同様に分解試験を行なった。インキュベーション後の試料は、等容量の2×SDS サンプルバッファーを加え5分間加熱し、5-20% SDS-PAGEにより分離した。HNF-4 $\alpha$ の検出は、実施例4と同様の方法で行なった。



### <結果>

第8図に示したように、ヒト $\mu$ -カルパインによるHNF-4 $\alpha$ の分解が認められた。一方、HNF-4 $\alpha$ はカルシウム非存在下、あるいは $\mu$ -カルパイン無添加試料では分解は認められなかった。これらから、HNF-4 $\alpha$ は $\mu$ -カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが判明した。

### 実施例 6

(イオノフォア添加によるヒトHNF-4 $\alpha$ の分解)

細胞内におけるHNF-4 $\alpha$ のカルパインによる分解を検討するため、カルシウムイオノフォア添加によるHNF-4 $\alpha$ 分解試験を実施した。

### <方法>

細胞数 $0.7 \times 10^6$ のHEK293T細胞を37℃にて5%CO<sub>2</sub>存在下で22時間培養した後(直径60mmシャーレ)、2 $\mu$ gのHNF-4 $\alpha$ 発現プラスミド(実施例2参照)をFuGENE6 Transfection Reagentを用いてトランスフェクションした。2日間培養後、イオノフォア A23187(4-bromo-calcium ionophore A23187、Sigma社)を10 $\mu$ g/mL添加した培地と交換し、3時間培養した。陰性対照群はイオノフォアの代わりにジメチルスルホキシド(DMSO)を添加した培地と交換した。所定時間培養後、細胞を冷却したPBS(-)で洗浄し、300 $\mu$ lの低張細胞溶解バッファー(10mM HEPES, pH7.5/10mM MgCl<sub>2</sub>/42mM KCl/1mM PMSF)に懸濁した後、氷上で20分間放置した。細胞をホモジナイザーで破碎後、4℃にて600gで10分間遠心処理し、その上清を細胞質画分、沈殿を核画分として回収した。核画分はさらに2 $\times$ PBS/1% ノニデットP-40/0.1% SDSからなる溶液に懸濁し、超音波処理にて破碎した。等容量の2 $\times$ SDS サンプルバッファーを加え、5分間加熱後、その上清を5-20% SDS-PAGEにより分離した。HNF-4 $\alpha$ の検出は、実施例4と同様の方法で行なった。

### <結果>

第9図AおよびBに示したように、イオノフォア添加によりHNF-4 $\alpha$ の分解が認められた。このことから、HNF-4 $\alpha$ は、細胞内においてカルシウム濃度の上昇に伴い、カルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインによって分解されたと考えられる。

## 5 実施例 7

(カルパインによるヒトHNF-1 $\alpha$ の分解)

m-カルパインおよび $\mu$ -カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解を、インビトロ蛋白質分解試験で検討した。

<材料>

10  $\mu$ -カルパインはヒト由来のもの（実施例5参照）を使用した。m-カルパインはウサギ由来のもの（実施例2参照）およびラット由来のもの（実施例4参照）を使用した。

ヒトHNF-1 $\alpha$ は、HNF-1 $\alpha$ 発現プラスミドを下記のように構築し、該プラスミドを用いて蛋白質の合成を行なうことにより得た。まず、ヒトHNF-1 $\alpha$  cDNAを、ヒト肝polyA<sup>+</sup>RNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により獲得し、シーケンスにより塩基配列を確認した。その後、N末端にHis-tagおよびExpress-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミドpcDNA3.1/HisにEcoRIおよびNotIサイトで組み込み、HNF-1 $\alpha$ 発現プラスミドを構築した。クローニングしたHNF-1 $\alpha$  cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号NP\_000536（登録遺伝子名はTCF1。）と同一であった。

20 HNF-1 $\alpha$ 発現プラスミドを用い、HNF-1 $\alpha$ 蛋白質の合成を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systemを使用してインビトロで行なった。すなわち、HNF-1 $\alpha$ 発現プラスミドとTNT T7 Quick Master Mixを混合し、メチオニン存在下で30℃にて1.5時間インキュベーションしてHNF-1 $\alpha$ を合成した。合成したHNF-1 $\alpha$ に、抗Express抗体を添加して4℃

で1時間転倒混和後、Protein G Sepharose 4 Fast Flowを加え、4℃でさらに1時間転倒混和することにより免疫沈降を行なった。ついで、遠心処理によりProtein G Sepharoseを回収し、洗淨バッファー（50mM Tris-HCl, pH7.5/150mM NaCl/0.2% ノニデットP-40）で3回洗淨した後に、200mM Tris-HCl（pH7.8）でリンスして20% スラリーとし、HNF-1 $\alpha$  試料とした（以下HNF-1 $\alpha$ スラリーと称する。）。

#### <方法>

インビトロにおける蛋白質分解試験は、HNF-1 $\alpha$ スラリーに $\mu$ -カルパインまたはm-カルパインを添加し、200mM Tris-HCl（pH7.8）/1mM DTT/6mM CaCl<sub>2</sub>存在下で37℃にて1時間インキュベーションすることにより行なった。各カルパインの反応系での最終濃度は、ヒト $\mu$ -カルパインは50unit/mL、ウサギm-カルパインは蛋白質濃度として50 $\mu$ g/mL、およびラットm-カルパインは59unit/mLとした。対照実験として、HNF-1 $\alpha$ スラリーをカルパインを添加せずにカルシウム存在下で同様にインキュベーションした。また、カルシウム非存在下での蛋白質分解試験を行なうために、6mM CaCl<sub>2</sub>の代わりに10mM EDTAを添加した試料を作製して同様にインキュベーションした。インキュベーション後の試料は、等容量の2 $\times$ SDS サンプルバッファーを加えて5分間加熱し、5-20% SDS-PAGEにより分離した。その後、His-Xpress領域を認識する抗Omni/M21抗体（Santa Cruz Biotechnology社）および抗HNF-1 $\alpha$ 抗体/HNF-1 $\alpha$ （C-19）抗体（Santa Cruz Biotechnology社）を用いてウェスタンブロットティング法によりHNF-1 $\alpha$ を検出した。検出はECL western blotting detection kitを使用して行なった。

#### <結果>

第10図に示したように、ヒト $\mu$ -カルパイン、ウサギm-カルパインおよび

ラットm-カルパインによるHNF-1 $\alpha$ のインビトロでの分解が認められた。一方、カルシウム非存在下またはm-カルパイン無添加ではHNF-1 $\alpha$ は分解されなかった。以上の結果から、HNF-1 $\alpha$ は $\mu$ -カルパインおよびm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

## 5 実施例 8

(ヒトm-カルパインによるHNF-1 $\alpha$ の分解)

ヒトm-カルパインによるヒトHNF-1 $\alpha$ の分解について検討するために、昆虫細胞で発現させたヒトm-カルパインを用いてインビトロ蛋白質分解試験を実施した。

## 10 <材料>

ヒトHNF-1 $\alpha$ は、実施例7で作製したもの(HNF-1 $\alpha$ スラリー)を用いた。

ヒトm-カルパインは、実施例4に記載の方法により昆虫細胞sf-9発現系で発現させ、該昆虫細胞ライセートをヒトm-カルパインとして用いた。また、  
15 蛋白質非発現sf-9細胞のライセートを同様に調製し、陰性対照として使用した。ライセートのm-カルパイン活性の有無は、基質としてカゼインを用いて確認した(非特許文献45)。また、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。

## <方法>

インビトロ蛋白質分解試験は、m-カルパインとして、m-カルパインおよび  
20 カルパインスモールサブユニット1を共発現させたsf-9細胞のライセートを用いた以外は、実施例7と同様の方法で行なった。これら蛋白質を発現させたsf-9細胞ライセートの反応系における最終濃度は、蛋白質濃度として1.75 mg/mLとした。ラットm-カルパインの反応系での最終濃度は59 unit/mLとした。HNF-1 $\alpha$ の検出は、抗HNF-1 $\alpha$ 抗体/HNF-1 $\alpha$  (C  
25 -19)抗体のみを用いた以外は実施例7と同様の方法で行なった。

## <結果>

第11図に示すように、ヒトm-カルパインによるヒトHNF-1 $\alpha$ の分解が

認められた。一方、カルシウム非存在下、非発現 s f - 9 細胞ライセート（図中、コントロール s f - 9 細胞ライセートと表示）およびカルパイン無添加（図中、対照と表示）ではいずれも H N F - 1  $\alpha$  の分解が認められなかった。これらから、H N F - 1  $\alpha$  はヒト m - カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが  
5 明らかになった。

### 実施例 9

（イオノフォア添加によるヒト H N F - 1  $\alpha$  の分解）

細胞内における H N F - 1  $\alpha$  のカルパインによる分解を検討するため、カルシウムイオノフォア添加による H N F - 1  $\alpha$  分解試験を実施した。

#### 10 <方法>

細胞数  $0.8 \times 10^6$  の H E K 2 9 3 T 細胞を  $37^\circ\text{C}$  にて  $5\% \text{CO}_2$  存在下で 5 時間培養した後（直径 60 mm シャーレ）、 $2 \mu\text{g}$  の H N F - 1  $\alpha$  発現プラスミド（実施例 7 参照）を F u G E N E 6 T r a n s f e c t i o n R e a g e n t を用いてトランスフェクションした。2 日間培養後、イオノフォア A 2 3 1  
15 8 7 （S i g m a 社） $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  および  $0.2\% \text{DMSO}$  を含有する培地と交換し、4 時間培養した。陰性対照群は  $0.2\% \text{DMSO}$  含有培地と交換した。所定時間培養後、細胞を冷却した P B S （－）で洗浄し、 $350 \mu\text{l}$  の低張細胞溶解バッファーに懸濁した後、氷上で 20 分間放置した。細胞をホモジナイザーで破碎後、 $4^\circ\text{C}$  にて  $600 \text{g}$  で 10 分間遠心処理し、その上清を細胞質画分、  
20 沈殿を核画分として回収した。核画分はさらに  $2 \times \text{P B S}/1\% \text{ノニデット P} - 40/0.1\% \text{SDS}$  からなる溶液に懸濁し、超音波処理にて破碎した。細胞画分は、C o o m a s s i e P l u s P r o t e i n A s s a y R e a g e n t K i t （P I E R C E 社）により蛋白質濃度を測定した。作成した各試料は等容量の  $2 \times \text{SDS}$  サンプルバッファーを加え、5 分間加熱後、その  
25 上清を  $5 - 20\% \text{SDS-PAGE}$  により分離した。H N F - 1  $\alpha$  の検出は、実施例 8 と同様の方法で行なった。

#### <結果>

第12図に示したように、イオノフォア添加によりHNF-1 $\alpha$ の分解が認められた。このことから、HNF-1 $\alpha$ は、細胞内においてカルシウム濃度の上昇に伴い、カルシウムイオン依存性システインプロテアーゼであるカルパインによって分解されたと考えられる。

## 5 実施例10

(カルパインによるヒトIPF-1の分解)

m-カルパインおよび $\mu$ -カルパインによるIPF-1の分解を、インビトロ蛋白質分解試験で検討した。

<材料>

- 10  $\mu$ -カルパインはヒト由来のもの（実施例5参照）を使用した。m-カルパインはウサギ由来のもの（実施例2参照）およびラット由来のもの（実施例4参照）を使用した。

- ヒトIPF-1は、IPF-1発現プラスミドを下記のように構築し、該プラスミドを用いて蛋白質の合成を行なうことにより得た。まず、ヒトIPF-1 cDNAを、ヒト肝polyA<sup>+</sup>RNAからRT-PCRにより獲得し、シーケンスにより塩基配列を確認した。その後、N末端にHis-tagおよびExpress-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミドpCDNA3.1/HisにBamHIおよびEcoRIサイトで組込み、IPF-1発現プラスミドを構築した。クローニングしたIPF-1 cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBI
- 15
- 20 Iデータベースのアクセッション番号NP\_000200（登録遺伝子名はIPF。）と同一であった。

- IPF-1発現プラスミドを用い、IPF-1蛋白質の合成を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systemを使用してインビトロで行なった。すなわち、IPF-1
- 25 発現プラスミドとTNT T7 Quick Master Mixを混合し、メチオニン存在下で30℃にて1.5時間インキュベーションしてIPF-1を合成した。

### <方法>

インビトロにおける蛋白質分解試験は、IPF-1に $\mu$ -カルパインまたはm-カルパインを添加し、200mM Tris-HCl (pH 7.8) / 1mM DTT / 6mM  $\text{CaCl}_2$ 存在下で37℃にて1時間インキュベーションすることにより行なった。各カルパインの反応系での最終濃度は、ヒト $\mu$ -カルパインは50 unit/mL、ウサギm-カルパインは蛋白質濃度として50  $\mu\text{g/mL}$ 、およびラットm-カルパインは59 unit/mLとした。対照実験として、IPF-1をカルパインを添加せずにカルシウム存在下で同様にインキュベーションした。また、カルシウム非存在下での蛋白質分解試験を行なうために、6mM  $\text{CaCl}_2$ の代わりに10mM EDTAを添加した試料を作製して同様にインキュベーションした。インキュベーション後の試料は、等容量の2×SDS サンプルバッファーを加えて5分間加熱し、5-20% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗Xpress抗体および抗IPF-1 (PDX-1) 抗体/N-18 (Santa Cruz Biotechnology社) を用いてウェスタンブロッティング法によりIPF-1を検出した。検出はECL western blotting detection kitを使用し

5

10

15

て行なった。

### <結果>

第13図AおよびBに示したように、ヒト $\mu$ -カルパイン、ウサギm-カルパインおよびラットm-カルパインによるIPF-1のインビトロでの分解が認められた。一方、カルシウム非存在下またはm-カルパイン無添加ではIPF-1は分解されなかった。以上の結果から、IPF-1は $\mu$ -カルパインおよびm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

20

### 実施例11

25 (ヒトm-カルパインによるIPF-1の分解)

ヒトm-カルパインによるヒトIPF-1の分解について検討するために、昆虫細胞で発現させたヒトm-カルパインを用いてインビトロ蛋白質分解試験を実

施した。

#### <材料>

ヒトIPF-1は、実施例10で作製したものを用いた。

5 ヒトm-カルパインは、実施例4に記載の方法により昆虫細胞sf-9発現系で発現させ、該昆虫細胞ライセートをヒトm-カルパインとして用いた。また、蛋白質非発現sf-9細胞のライセートを同様に調製し、陰性対照として使用した。ライセートのm-カルパイン活性の有無は、基質としてカゼインを用いて確認した(非特許文献45)。また、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。

#### <方法>

10 インビトロ蛋白質分解試験は、m-カルパインとして、m-カルパインおよびカルパインスモールサブユニット1を共発現させたsf-9細胞のライセートを用いた以外は、実施例10と同様の方法で行なった。これら蛋白質を発現させたsf-9細胞ライセートの反応系における最終濃度は、蛋白質濃度として2.33mg/mLとした。ラットm-カルパインの反応系での最終濃度は59unit/mLとした。IPF-1の検出は、抗IPF-1抗体/N-18のみを用いた以外は実施例10と同様の方法で行なった。

#### <結果>

第14図に示すように、ヒトm-カルパインによるヒトIPF-1の分解が認められた。一方、カルシウム非存在下、非発現sf-9細胞ライセート(図中、20 コントロールsf-9細胞ライセートと表示)およびカルパイン無添加(図中、対照と表示)ではいずれもIPF-1の分解が認められなかった。これらから、IPF-1はヒトm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

#### 実施例12

25 (イオノフォア添加によるヒトIPF-1の分解)

細胞内におけるIPF-1のカルパインによる分解を検討するため、カルシウムイオノフォア添加によるIPF-1分解試験を実施した。



### <方法>

細胞数  $0.5 \times 10^6$  の HEK 293 T 細胞を  $37^\circ\text{C}$  にて  $5\% \text{CO}_2$  存在下で 24 時間培養した後 (直径 60 mm シャーレ)、 $2 \mu\text{g}$  の IPF-1 発現プラスミド (実施例 10 参照) を FUGENE 6 Transfection Reagent を用いてトランスフェクションした。2 日間培養後、イオノフォア A23187 (Sigma 社)  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  を添加した培地と交換し、4 時間培養した。陰性対照群は  $0.2\% \text{DMSO}$  含有培地と交換した。所定時間培養後、細胞を冷却した PBS (-) で洗浄し、 $350 \mu\text{L}$  の低張細胞溶解バッファーに懸濁した後、氷上で 20 分間放置した。細胞をホモジナイザーで破碎後、 $4^\circ\text{C}$  にて  $600 \text{g}$  で 10 分間遠心処理し、その上清を細胞質画分、沈殿を核画分として回収した。核画分はさらに  $2 \times \text{PBS} / 1\% \text{ノニデットP} - 40 / 0.1\% \text{SDS}$  からなる溶液に懸濁し、超音波処理にて破碎した。核画分および細胞画分は、等容量の  $2 \times \text{SDS}$  サンプルバッファーを加えて 5 分間加熱後、 $5 - 20\% \text{SDS-PAGE}$  により分離した。IPF-1 の検出は、実施例 10 と同様の方法で行なった。

### <結果>

第 15 図に示したように、イオノフォア添加により IPF-1 の分解が認められた。このことから、IPF-1 は、細胞内においてカルシウム濃度の上昇に伴い、カルシウムイオン依存性システインプロテアーゼであるカルパインによって分解されたと考えられる。

### 産業上の利用可能性

本発明においては、転写因子としての作用を有する HNF-4 $\alpha$ 、HNF-1 $\alpha$  および IPF-1 が、カルパインにより分解されることを見出したことに基づき、カルパインによるこれら転写因子の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤を提供した。これら転写因子は、膵臓の  $\beta$  細胞において転写因子ネットワーク

を形成しており、インシュリンやGLUT 2などの糖代謝関連遺伝子発現に関与していること、および遺伝性2型糖尿病の原因遺伝子であることが知られている。これらから、カルパインの分解による糖代謝関連遺伝子発現に関与する転写因子の減少や機能欠損は糖尿病の原因になると考えられる。したがって、本発明において提供する糖代謝関連遺伝子発現に関与する転写因子分解阻害剤および／または該転写因子分解阻害方法により、該転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進、例えばインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進が可能になる。また、該転写因子が作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。具体的には、例えばインシュリンの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止および／または治療が可能である。このように本発明は、糖代謝関連遺伝子発現に関与する転写因子の過剰な分解に起因する疾患の防止および／または治療のために非常に有用である。

#### 配列表フリーテキスト

15 配列番号4：ヒトm-カルパインまたはウサギm-カルパインとヒトHNF-4 $\alpha$ （配列番号1）のローカルアライメントにおいて高いスコアを示す、ヒトm-カルパインまたはウサギm-カルパインの部分ペプチド。

配列番号5：ヒトm-カルパインまたはウサギm-カルパインとヒトHNF-4 $\alpha$ （配列番号1）のローカルアライメントにおいて高いスコアを示す、ヒトHNF-4 $\alpha$ （配列番号1）の部分ペプチド。

20

## 請求の範囲

1. カルシウムの存在下、カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを共存させることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解方法。
- 5 2. カルシウム濃度により糖代謝関連遺伝子の転写因子分解程度を変えることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解方法。
3. カルシウムの存在下、 $m$ -カルパインおよび/ $\mu$ -カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを共存させることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解方法。
- 10 4. 糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター  $4\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター  $1\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つである、請求の範囲第 1 項から第 3 項のいずれか 1 項に記載の分解方法。
5. カルシウムの存在下、 $m$ -カルパインおよび/ $\mu$ -カルパインとヘ  
15 パトサイトヌクレアーファクター  $4\alpha$  (HNF- $4\alpha$ ) を共存させることを特徴とする、HNF- $4\alpha$  の分解方法。
6. カルシウムの存在下、 $m$ -カルパインおよび/ $\mu$ -カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター  $1\alpha$  (HNF- $1\alpha$ ) を共存させることを特徴とする、HNF- $1\alpha$  の分解方法。
- 20 7. カルシウムの存在下、 $m$ -カルパインおよび/ $\mu$ -カルパインとインシュリンプロモーターファクター 1 (IPF-1) を共存させることを特徴とする、IPF-1 の分解方法。
8. カルパイン活性を阻害することを特徴とする糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
- 25 9. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子切断を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
10. カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子との結合を阻害することを特

徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。

- 1 1. 少なくともカルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
- 5 1 2. 少なくともカルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子とを発現している細胞をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
- 1 3. 細胞が哺乳動物に担持されている細胞である請求の範囲第 1 2 項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
- 10 1 4. 哺乳動物に担持されている細胞が膵臓  $\beta$  細胞である請求の範囲第 1 3 項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
- 1 5. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、糖代謝関連遺伝子の転写因子を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる 1 つ以上の物質である請求の範囲第 1 1 項から第 1 4 項のいずれか 1 項  
15 に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
- 1 6. カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-  
20 Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Cl または Z-Val-Phe-CHO である請求の範囲第 1 5 項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。
- 1 7. カルパイン活性を阻害する物質がカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求の範囲第 1 1 項から第 1 4 項のいずれか 1 項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。  
25
- 1 8. カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号 1 から 3 のいずれか

に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり、  
且つカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位の少なく  
とも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求の範囲第11項から第1  
4項のいずれか1項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。

5 19. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位がL e u  
-T y r、L e u-M e t、L e u-A r g、V a l-T y r、V a l-M  
e tおよびV a l-A r gからなる群より選ばれるものである請求の範囲第  
18項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。

10 20. カルパインがm-カルパインおよび/またはμ-カルパインである請求  
の範囲第8項から第19項のいずれか1項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写  
因子分解阻害方法。

15 21. 糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4α、  
ヘパトサイトヌクレアーファクター1αおよびインシュリンプロモーターフ  
ァクター1から選ばれる少なくとも1つである、請求の範囲第8項から第2  
0項のいずれか1項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害方法。

22. m-カルパインおよび/またはμ-カルパインの活性を阻害することを  
特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター4αの分解阻害方法。

23. m-カルパインおよび/またはμ-カルパインの活性を阻害することを  
特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター1αの分解阻害方法。

20 24. m-カルパインおよび/またはμ-カルパインの活性を阻害することを  
特徴とするインシュリンプロモーターファクター1の分解阻害方法。

25. カルパインを活性成分として有効量含んでなる糖代謝関連遺伝子の転写  
因子分解剤。

26. カルパインがm-カルパインおよび/またはμ-カルパインである請求  
の範囲第25項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解剤。

27. 糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4α、  
ヘパトサイトヌクレアーファクター1αおよびインシュリンプロモーターフ

アクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つである、請求の範囲第 25 項または第 26 項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解剤。

28. m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインを活性成分として有効量含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$  の分解剤。

5 29. m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインを活性成分として有効量含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  の分解剤。

30. m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインを活性成分として有効量含んでなるインシュリンプロモーターファクター 1 の分解剤。

10 31. カルパイン活性を阻害することを特徴とする糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。

32. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子切断を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。

33. カルパインと糖代謝関連遺伝子の転写因子との結合を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。

15 34. カルパイン活性を阻害する物質を活性成分として有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。

35. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、糖代謝関連遺伝子の転写因子を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる 1 つ以上の物質である請求の範囲第 34 項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。

20 36. カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH<sub>2</sub>F、Mu-Val-HPh-CH<sub>2</sub>F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH<sub>2</sub>Cl または Z-Val-Phe-CHO である請求の範囲第 35 項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。

37. カルパイン活性を阻害する物質がカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求の範囲第34項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解阻害剤。
38. カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1から3のいずれかに記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求の範囲第34項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。
39. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の切断認識部位が Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-Met および Val-Arg からなる群より選ばれるものである請求の範囲第38項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。
40. カルパインが m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインである請求の範囲第31項から第39項のいずれか1項に記載の糖代謝関連遺伝子の転写因子分解阻害剤。
41. 糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つである、請求の範囲第31項から第40項のいずれか1項に記載の分解阻害剤。
42. m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 分解阻害剤。
43. m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ 分解阻害剤。
44. m-カルパインおよび/または  $\mu$ -カルパインの活性を阻害することを特徴とする、インシュリンプロモーターファクター1分解阻害剤。
45. 糖代謝関連遺伝子の転写因子をカルパインを用いて分解することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法。

- 4 6. カルパインが $m$ -カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインである請求の範囲第 4 5 項に記載の糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法。
- 4 7. ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つの転写因子を $m$ -カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインを用いて分解することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法。
- 4 8. 糖代謝関連遺伝子がインシュリン遺伝子またはグルコーストランスポーター 2 遺伝子である請求の範囲第 4 5 項から第 4 7 項のいずれか 1 項に記載の糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生阻害方法。
- 4 9. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子分解を阻害することを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法。
- 5 0. カルパインが $m$ -カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインである請求の範囲第 4 9 項に記載の糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法。
- 5 1.  $m$ -カルパインおよび/または $\mu$ -カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つの分解を阻害することを特徴とする糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法。
- 5 2. 糖代謝関連遺伝子がインシュリン遺伝子またはグルコーストランスポーター 2 遺伝子である請求の範囲第 4 9 項から第 5 1 項のいずれか 1 項に記載の糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法。
- 5 3. カルシウム濃度により糖代謝関連遺伝子の分解程度を変えることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生調節方法。
- 5 4. カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つの分解程度を変えることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生調節方法。
- 5 5. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻



害方法を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法。

5 6. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻  
害方法を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、  
5 ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターフ  
ァクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つが転写因子として作用する遺伝子の  
遺伝子産物の産生促進方法。

5 7. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻  
害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグル  
10 コストランスポーター 2 遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

5 8. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻  
害方法を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解に起  
因する疾患の防止方法および／または治療方法。

5 9. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻  
15 害方法を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4、  
ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターフ  
ァクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つの分解に起因する疾患の防止方法お  
よび／または治療方法。

6 0. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻  
20 害方法を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に  
起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

6 1. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻  
害方法を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、  
ヘパトサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターフ  
25 ァクター 1 から選ばれる少なくとも 1 つが転写因子として作用する遺伝子の  
遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

6 2. 請求の範囲第 8 項から第 2 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解阻

害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

63. 請求の範囲第8項から第24項のいずれか1項に記載の転写因子分解阻  
害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

64. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進方法。

65. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

66. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグルコーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

67. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

68. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つの分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

69. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解阻害剤を用いることを特徴とする、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に

起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

70. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
阻害剤を用いることを特徴とする、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、  
ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターフ  
5     ァクター1から選ばれる少なくとも1つが転写因子として作用する遺伝子の  
遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

71. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子および／またはグル  
コーストランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止  
10     方法および／または治療方法。

72. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方  
法。

73. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
15     阻害剤を有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物産生促進剤。

74. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
阻害剤を有効量含んでなる、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパ  
トサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファク  
ター1から選ばれる少なくとも1つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝  
20     子産物の産生促進剤。

75. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
阻害剤を有効量含んでなる、インシュリン遺伝子および／またはグルコース  
トランスポーター2遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤。

76. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
25     阻害剤を有効量含んでなる医薬組成物。

77. 請求の範囲第31項から第44項のいずれか1項に記載の転写因子分解  
阻害剤を有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解に起因する

疾患の防止剤および／または治療剤。

- 7 8. 請求の範囲第 3 1 項から第 4 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解  
阻害剤を有効量含んでなる、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパ  
トサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファク  
5 ター 1 から選ばれる少なくとも 1 つの分解に起因する疾患の防止剤および／  
または治療剤。
- 7 9. 請求の範囲第 3 1 項から第 4 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解  
阻害剤を有効量含んでなる、糖代謝関連遺伝子の遺伝子産物の減少に起因す  
る疾患の防止剤および／または治療剤。
- 10 8 0. 請求の範囲第 3 1 項から第 4 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解  
阻害剤を有効量含んでなる、ヘパトサイトヌクレアーファクター 4  $\alpha$ 、ヘパ  
トサイトヌクレアーファクター 1  $\alpha$  およびインシュリンプロモーターファク  
ター 1 から選ばれる少なくとも 1 つが転写因子として作用する遺伝子の遺伝  
子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。
- 15 8 1. 請求の範囲第 3 1 項から第 4 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解  
阻害剤を有効量含んでなる、インシュリン遺伝子および／またはグルコース  
トランスポーター 2 遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤およ  
び／または治療剤。
- 8 2. 請求の範囲第 3 1 項から第 4 4 項のいずれか 1 項に記載の転写因子分解  
20 阻害剤を有効量含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤。
- 8 3. 請求の範囲第 2 3 項に記載の分解阻害方法を用いることを特徴とする、肝  
細胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法。
- 8 4. 請求の範囲第 4 3 項に記載の分解阻害剤を用いることを特徴とする、肝細  
胞腺腫または肝細胞癌の防止方法および／または治療方法。
- 25 8 5. 請求の範囲第 4 3 項に記載の分解阻害剤を有効量含んでなる、肝細胞腺腫  
または肝細胞癌の防止剤および／または治療剤。
- 8 6. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子分解を阻害する化合物の

同定方法であって、カルパインによる該転写因子切断を可能にする条件下、カルパインおよび／または該転写因子と被検化合物を接触させ、カルパインによる該転写因子の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによる該転写因子の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

8 7. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによる該転写因子の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／または該転写因子と被検化合物を接触させ、該転写因子量または該転写因子分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによる該転写因子の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

8 8. カルパインによる糖代謝関連遺伝子の転写因子の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインと該転写因子の結合を可能にする条件下、カルパインおよび／または該転写因子と被検化合物を接触させ、カルパインと該転写因子の結合を検出するシグナルおよび／またはマーカを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインと該転写因子の結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

8 9. カルパインが、 $m$ -カルパインまたは $\mu$ -カルパインである請求の範囲第86項から第88項のいずれか1項に記載の同定方法。

9 0. 糖代謝関連遺伝子の転写因子が、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 $\alpha$ 、ヘパトサイトヌクレアーファクター1 $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1から選ばれる少なくとも1つである請求の範囲第86項から第89項のいずれか1項に記載の同定方法。

9 1. 請求の範囲第86項から第90項のいずれか1項に記載の同定方法で同

定された化合物。

9 2. カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパイン  
をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいず  
れか1つと、カルパインにより分解される糖代謝関連遺伝子の転写因子、該  
5 転写因子をコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチドを含有す  
るベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キット。

9 3. カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパイン  
をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいず  
れか1つ、並びにヘパトサイトヌクレアーファクター4  $\alpha$ 、ヘパトサイトヌ  
10 クレアーファクター1  $\alpha$ およびインシュリンプロモーターファクター1およ  
びこれらいずれかをコードするポリヌクレオチドおよび該ポリヌクレオチド  
を含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キッ  
ト。

9 4. カルパインが、m-カルパインまたは $\mu$ -カルパインである請求の範囲第  
15 9 2項または第9 3項に記載の試薬キット。

1/9

図面

## 第1図

1 MDMADYSAAL DPAYTTLEFE NVQVLTMGND TSPSEGTNLN APNSLGVSAL CAICGDRATG  
61 KHYGASSCDG CKGFFRRSVR\_KNHMYSCRFS RQCVVDKDKR NQCRYCRLKK CFRAGMKKEA  
121 VQNERDRIST RRSSYEDSSL PSINALLQAE VLSRQITSPV SGINGDIRAK KIASIADVCE  
181 SMKEQLLVLV EWAKYIPAFG ELPLDDQVAL\_LRAHAGEHLL LGATKRSMVF KDVLLLGN DY  
241 IVPRHCPELA EMSRV SIRIL DELVL PFQEL QIDDNEYAYL KAIIFFDPA KGLSDPGKIK  
301 RLRSQVQVSL EDYINDRQYD SRGRFGELL LLPTLQSITW QMIEQIQFIK LFGMAKIDNL  
361 LQEMLLGGSP SDAPHAHPL HPHLMQE HMG TNVIVANTMP THLSNGQMCE WPRPRGQAAT  
421 PETPQPSPPG GSGSEPYKLL PGAVATIVKP LSAIPQPTIT KQEV I (配列番号1)

## 第2図

1 MVSKLSQLQT ELLAALLES LSKEALIQAL GEPGPYLLAG EGPLDKGESC GGGRGELAE L  
61 PNGLGETRGS EDETDG DGED FTPIILKELE NLSPEEAAHQ KAVVETLLQE DPWRVAKMVK  
121 SYLQQHNIPQ REVVDTTGLN QSHLSQH LNK GTPMKTQKRA\_ ALYTWYVRKQ REVAQQFTHA  
181 GQGGLIEEPT GDELPTKKGR RNRFKWGPAS QQILFQAYER QKNPSKEERE TLVEECNRAE  
241 CIQRGVSPSQ AQGLGSNLVT\_EVRVYNWFAN RRKEEAFRHK LAMDTYSGPP PGPGP GPALP  
301 AHSSPGLPPP ALSPSKVHGV\_RXGQPATSET AEVPSSSGGP LVTVSTPLHQ VSPTGLEPSH  
361 SLLSTEAKLV SAAGGPLPPV STLTALHSLE QTSPGLNQPP QNLIMASLPG\_VMTIGPG EPA  
421 SLGPTFTNTG ASTLVIGLAS TQAQSVPVIN SMGSSLTTLQ PVQFSQPLHP SYQQPLMP PV  
481 QSHVTQSPFM ATMAQLQSPH\_ ALYSHKPEVA QYHTGLLPQ TMLITDTTNL SALASLTPTK  
541 QVFTSDTEAS SESGLHTPAS QATTLHVPSQ DPAGIQHLQP AHRLSASPTV SSSSLVLYQS  
601 SDSSNGQSHL LPSNH SVIET FISTQMASSS Q (配列番号2)

## 第3図

1 MNGEEQYYAA TQLYKDPCAF QRGPAPEFSA SPPACLYMGR QPPPPPPHPF PGALGALEQG  
61 SPPDISPYEV PPLADDPAVA HLHHHLPAQL ALPHPPAGPF PEGAEPGVLE EPNRVQLPFP  
121 WMKSTKAHAW KGQWAGGAYA AEPEENKRTR TAYTRAQLE LEKEFLFNKY ISRPRVELA  
181 VMLNLTERHI KIWFQNRMRK WKKEEDKKRG GGTAVGGGGV AEPEQDCAVT SGEELLALPP  
241 PPPPGGAVPP AAPVAAREGR LPPGLSASPQ PSSVAPRRPQ EPR (配列番号3)

## 第4図

**A**

475 FKLPPG (ヒトm-カルパイン) (配列番号4)

437 YKLLPG (ヒトHNF-4 $\alpha$ ) (配列番号5)

KL PG

**B**

197 FKLPPG (ウサギm-カルパイン) (配列番号4)

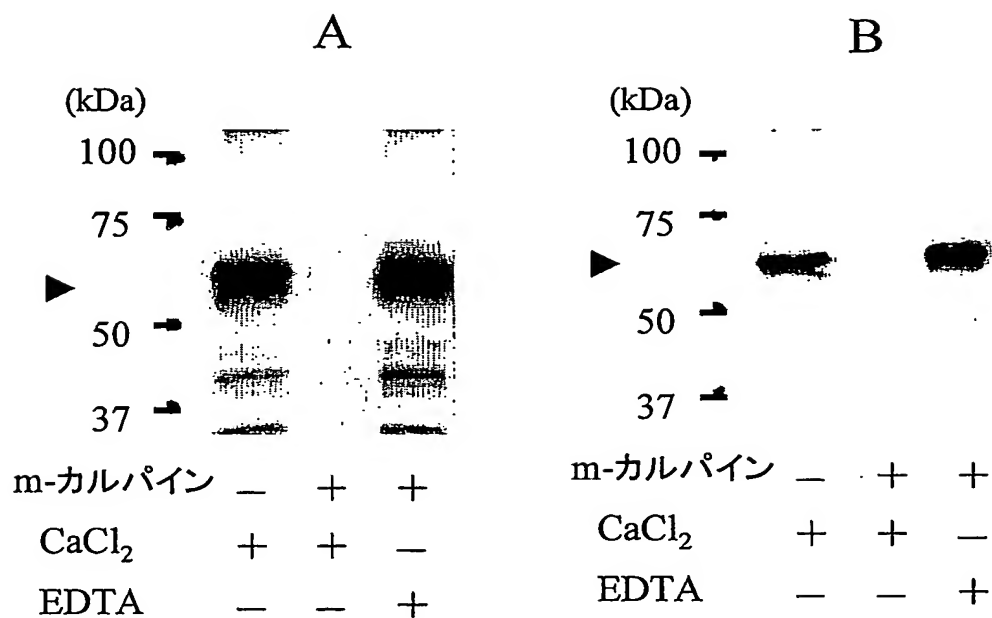
437 YKLLPG (ヒトHNF-4 $\alpha$ ) (配列番号5)

KL PG

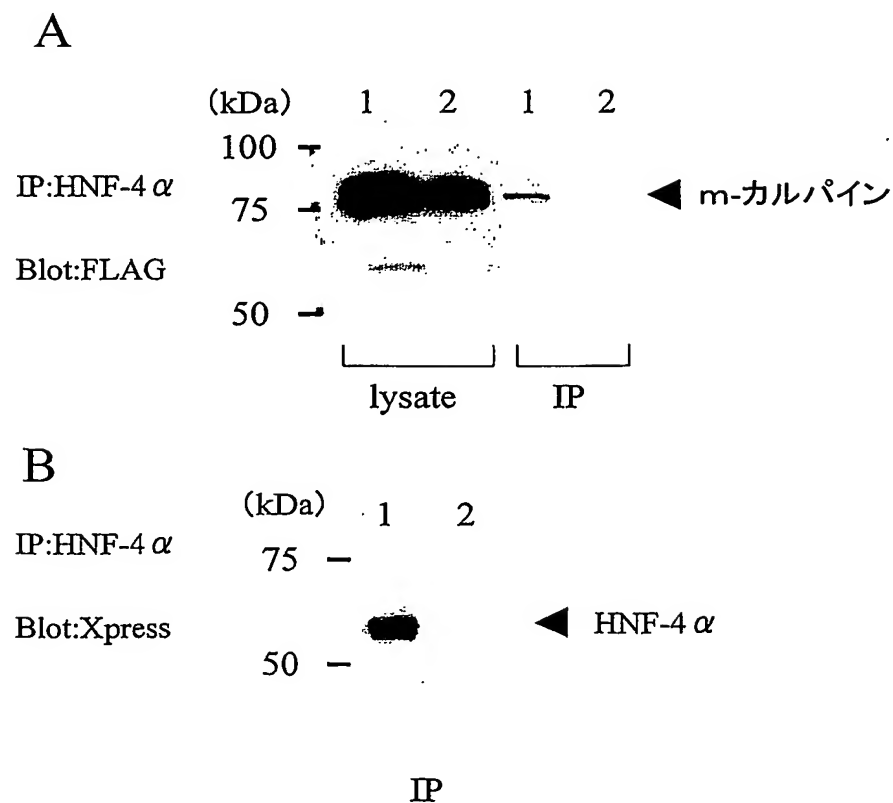


3/9

第5図

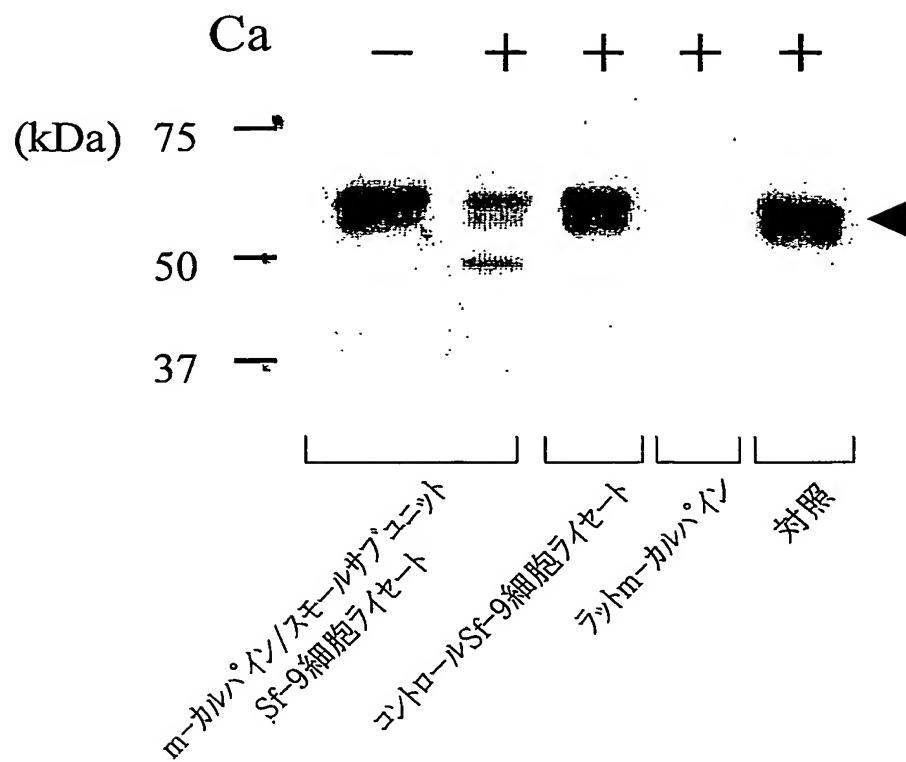


第6図

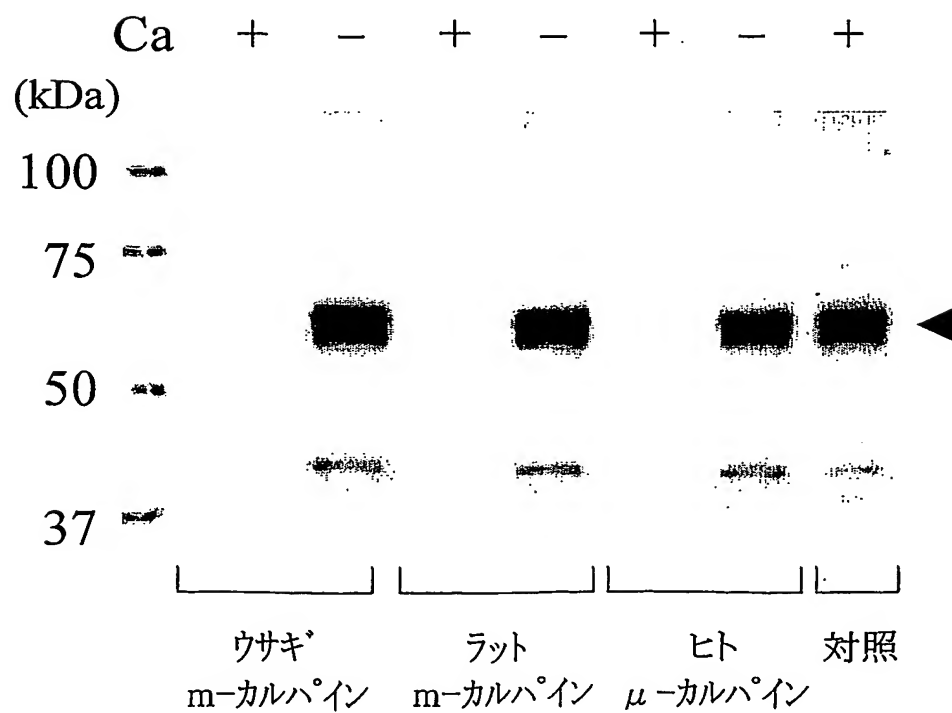


4/9

第7図

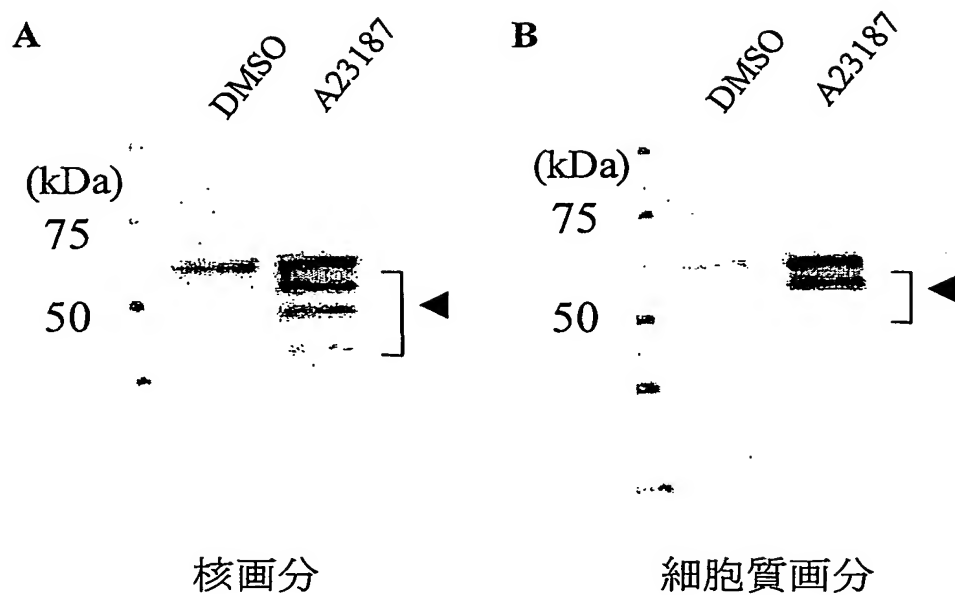


第8図

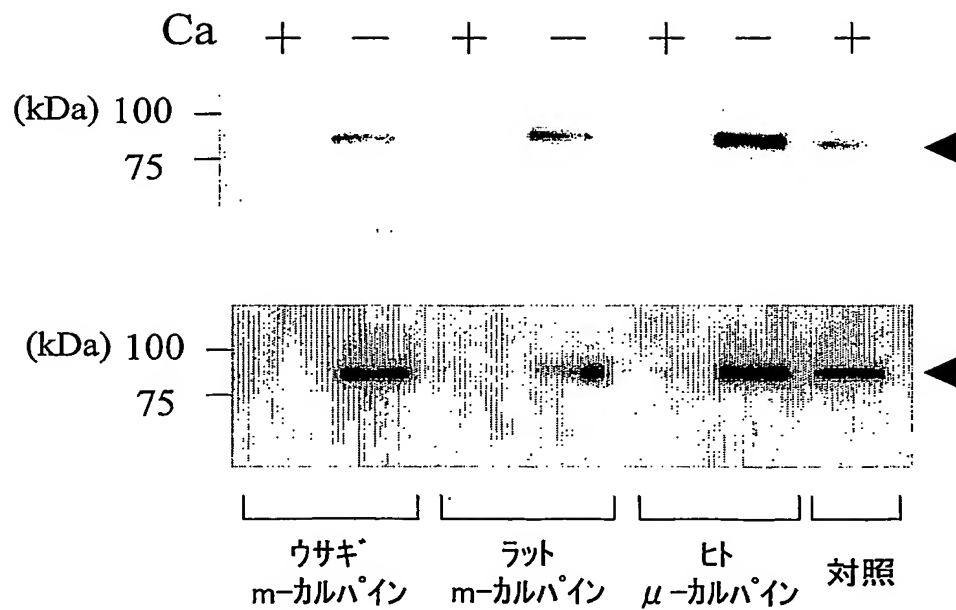


5/9

第 9 図

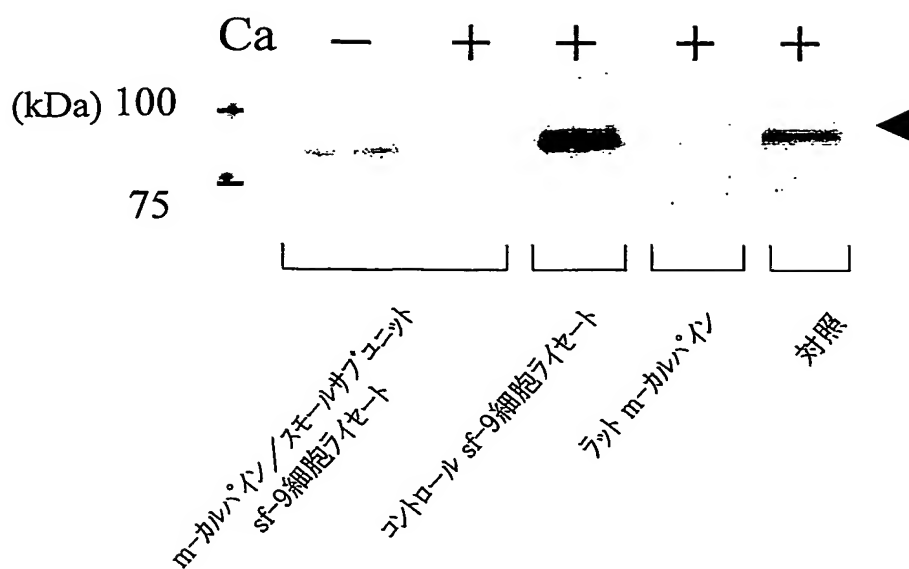


第 10 図

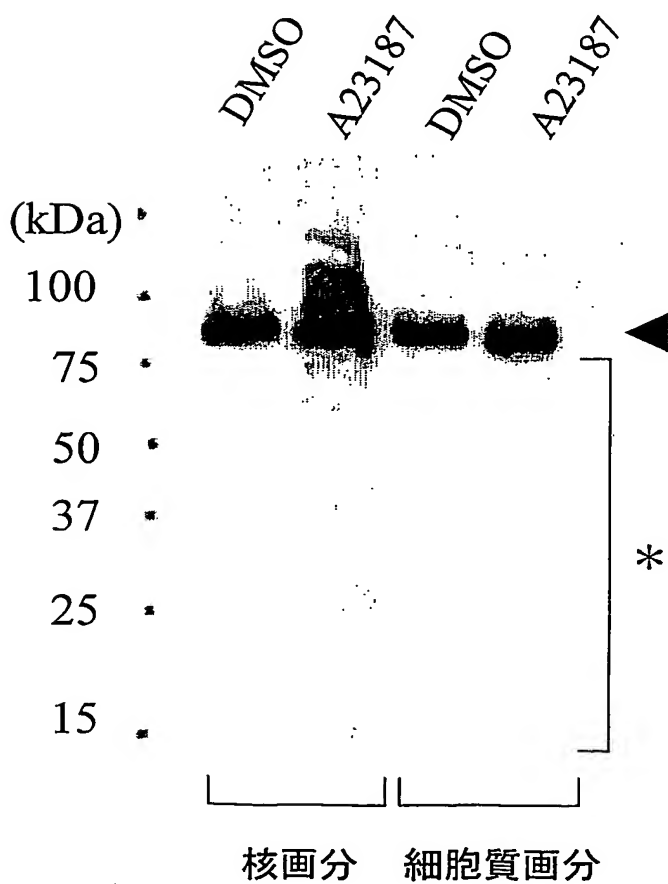


6/9

第 1 1 図

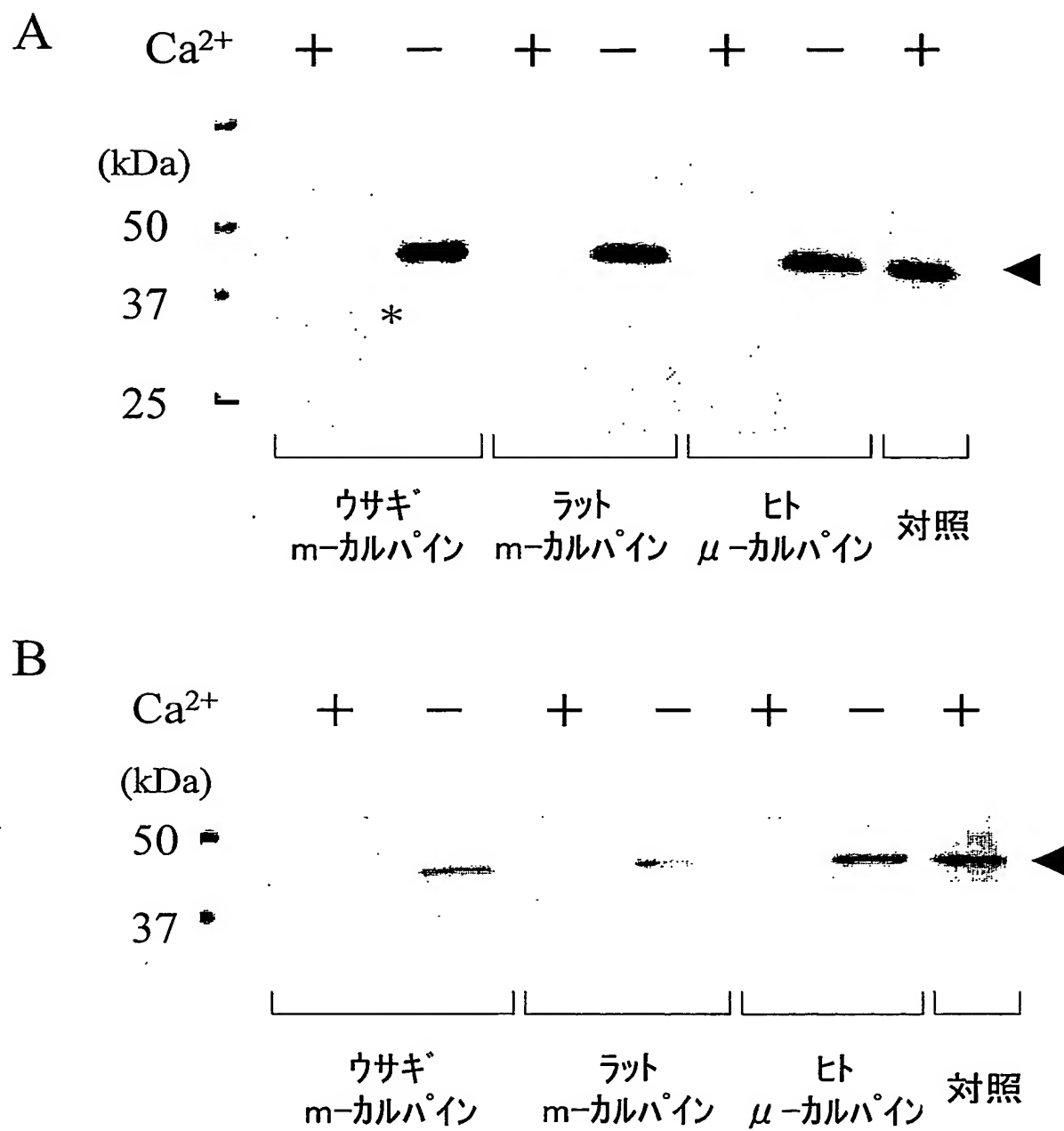


第 1 2 図



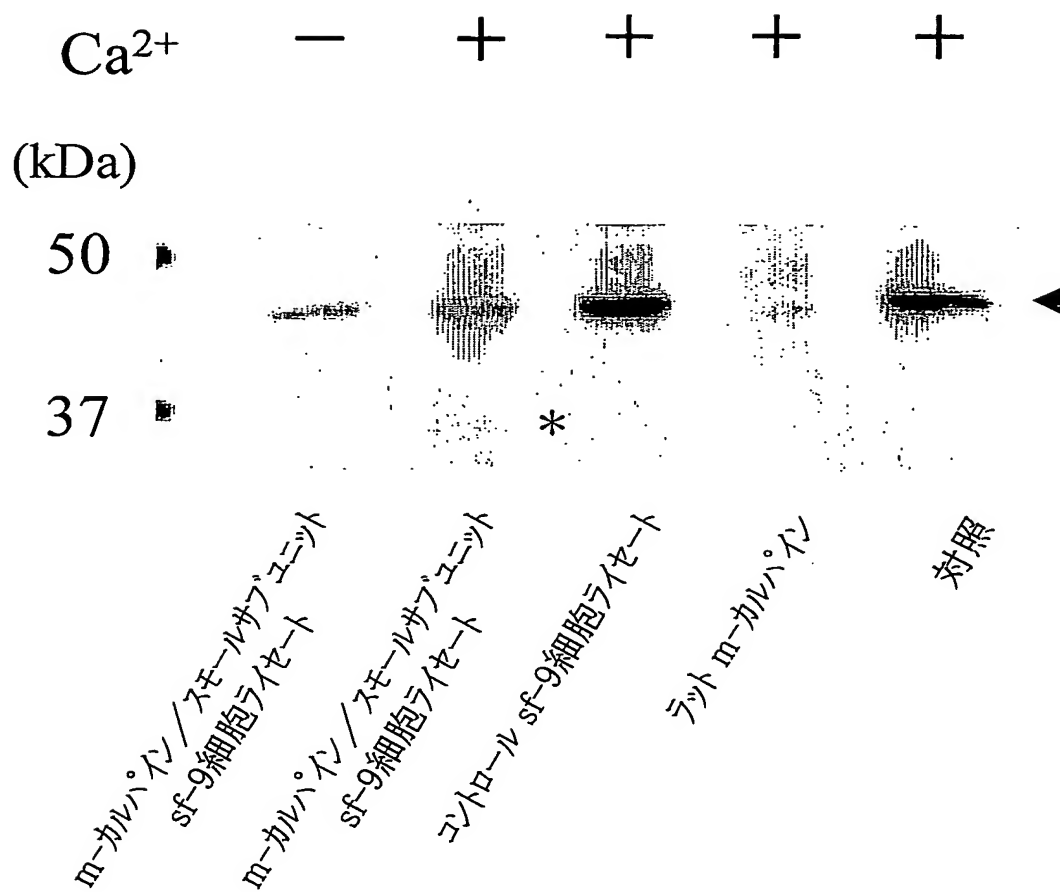
7/9

第13図



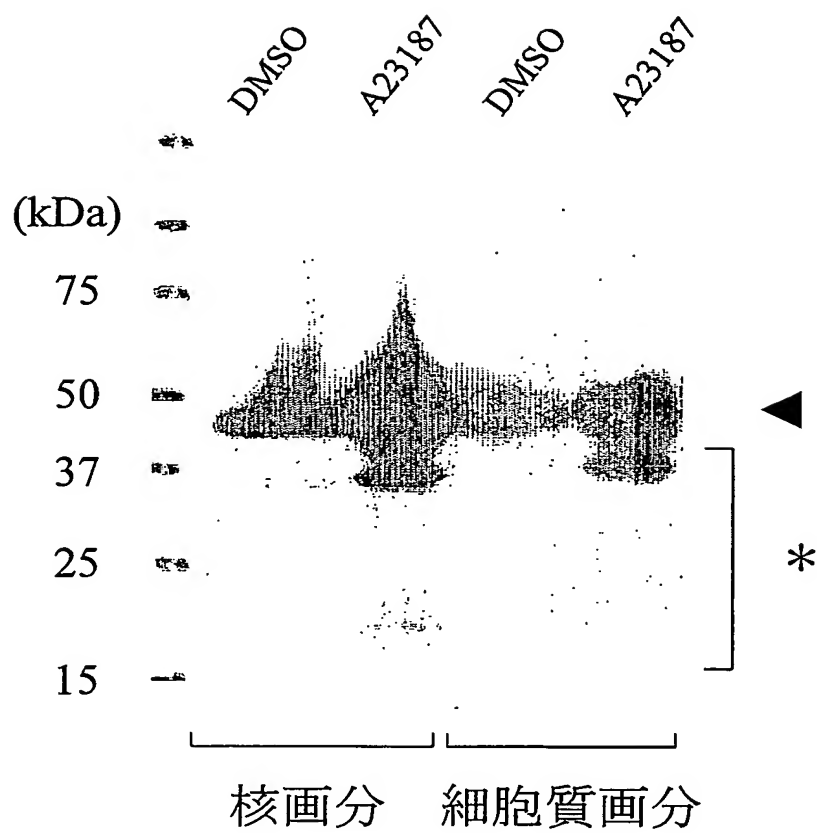
8/9

第14図



9/9

第15図



## SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> A method of degradation of transcription factors participating in expression of genes that relate to glucose metabolism, and a method and composition for inhibiting the degradation of the same

<130> GP03-1026PCT

<150> JP P2002-254973

<151> 2002-08-30

<150> JP P2003-96370

<151> 2003-03-31

<150> JP P2003-96371

<151> 2003-03-31

<150> JP P2003-96372

<151> 2003-03-31

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Met Ala Asp Tyr Ser Ala Ala Leu Asp Pro Ala Tyr Thr Thr  
1 5 10 15

Leu Glu Phe Glu Asn Val Gln Val Leu Thr Met Gly Asn Asp Thr Ser  
20 25 30

Pro Ser Glu Gly Thr Asn Leu Asn Ala Pro Asn Ser Leu Gly Val Ser  
35 40 45

Ala Leu Cys Ala Ile Cys Gly Asp Arg Ala Thr Gly Lys His Tyr Gly  
50 55 60

Ala Ser Ser Cys Asp Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Arg  
65 70 75 80

Lys Asn His Met Tyr Ser Cys Arg Phe Ser Arg Gln Cys Val Val Asp  
85 90 95



2/8

Lys Asp Lys Arg Asn Gln Cys Arg Tyr Cys Arg Leu Lys Lys Cys Phe  
100 105 110

Arg Ala Gly Met Lys Lys Glu Ala Val Gln Asn Glu Arg Asp Arg Ile  
115 120 125

Ser Thr Arg Arg Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Leu Pro Ser Ile Asn  
130 135 140

Ala Leu Leu Gln Ala Glu Val Leu Ser Arg Gln Ile Thr Ser Pro Val  
145 150 155 160

Ser Gly Ile Asn Gly Asp Ile Arg Ala Lys Lys Ile Ala Ser Ile Ala  
165 170 175

Asp Val Cys Glu Ser Met Lys Glu Gln Leu Leu Val Leu Val Glu Trp  
180 185 190

Ala Lys Tyr Ile Pro Ala Phe Cys Glu Leu Pro Leu Asp Asp Gln Val  
195 200 205

Ala Leu Leu Arg Ala His Ala Gly Glu His Leu Leu Leu Gly Ala Thr  
210 215 220

Lys Arg Ser Met Val Phe Lys Asp Val Leu Leu Leu Gly Asn Asp Tyr  
225 230 235 240

Ile Val Pro Arg His Cys Pro Glu Leu Ala Glu Met Ser Arg Val Ser  
245 250 255

Ile Arg Ile Leu Asp Glu Leu Val Leu Pro Phe Gln Glu Leu Gln Ile  
260 265 270

Asp Asp Asn Glu Tyr Ala Tyr Leu Lys Ala Ile Ile Phe Phe Asp Pro  
275 280 285

Asp Ala Lys Gly Leu Ser Asp Pro Gly Lys Ile Lys Arg Leu Arg Ser  
290 295 300

Gln Val Gln Val Ser Leu Glu Asp Tyr Ile Asn Asp Arg Gln Tyr Asp  
305 310 315 320

3/8

Ser Arg Gly Arg Phe Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr Leu Gln  
 325 330 335

Ser Ile Thr Trp Gln Met Ile Glu Gln Ile Gln Phe Ile Lys Leu Phe  
 340 345 350

Gly Met Ala Lys Ile Asp Asn Leu Leu Gln Glu Met Leu Leu Gly Gly  
 355 360 365

Ser Pro Ser Asp Ala Pro His Ala His His Pro Leu His Pro His Leu  
 370 375 380

Met Gln Glu His Met Gly Thr Asn Val Ile Val Ala Asn Thr Met Pro  
 385 390 395 400

Thr His Leu Ser Asn Gly Gln Met Cys Glu Trp Pro Arg Pro Arg Gly  
 405 410 415

Gln Ala Ala Thr Pro Glu Thr Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gly Gly Ser  
 420 425 430

Gly Ser Glu Pro Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Ala Val Ala Thr Ile Val  
 435 440 445

Lys Pro Leu Ser Ala Ile Pro Gln Pro Thr Ile Thr Lys Gln Glu Val  
 450 455 460

Ile  
 465

<210> 2  
 <211> 631  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (322).. (322)  
 <223> UNSURE

Xaa may be Tyr since it has been shown in many reports that the  
 codon of Xaa is tat.

<400> 2

Met Val Ser Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr Glu Leu Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15

4/8

Leu Glu Ser Gly Leu Ser Lys Glu Ala Leu Ile Gln Ala Leu Gly Glu  
20 25 30

Pro Gly Pro Tyr Leu Leu Ala Gly Glu Gly Pro Leu Asp Lys Gly Glu  
35 40 45

Ser Cys Gly Gly Gly Arg Gly Glu Leu Ala Glu Leu Pro Asn Gly Leu  
50 55 60

Gly Glu Thr Arg Gly Ser Glu Asp Glu Thr Asp Asp Asp Gly Glu Asp  
65 70 75 80

Phe Thr Pro Pro Ile Leu Lys Glu Leu Glu Asn Leu Ser Pro Glu Glu  
85 90 95

Ala Ala His Gln Lys Ala Val Val Glu Thr Leu Leu Gln Glu Asp Pro  
100 105 110

Trp Arg Val Ala Lys Met Val Lys Ser Tyr Leu Gln Gln His Asn Ile  
115 120 125

Pro Gln Arg Glu Val Val Asp Thr Thr Gly Leu Asn Gln Ser His Leu  
130 135 140

Ser Gln His Leu Asn Lys Gly Thr Pro Met Lys Thr Gln Lys Arg Ala  
145 150 155 160

Ala Leu Tyr Thr Trp Tyr Val Arg Lys Gln Arg Glu Val Ala Gln Gln  
165 170 175

Phe Thr His Ala Gly Gln Gly Gly Leu Ile Glu Glu Pro Thr Gly Asp  
180 185 190

Glu Leu Pro Thr Lys Lys Gly Arg Arg Asn Arg Phe Lys Trp Gly Pro  
195 200 205

Ala Ser Gln Gln Ile Leu Phe Gln Ala Tyr Glu Arg Gln Lys Asn Pro  
210 215 220

Ser Lys Glu Glu Arg Glu Thr Leu Val Glu Glu Cys Asn Arg Ala Glu  
225 230 235 240

Cys Ile Gln Arg Gly Val Ser Pro Ser Gln Ala Gln Gly Leu Gly Ser

5/8

245

250

255

Asn Leu Val Thr Glu Val Arg Val Tyr Asn Trp Phe Ala Asn Arg Arg  
 260 265 270

Lys Glu Glu Ala Phe Arg His Lys Leu Ala Met Asp Thr Tyr Ser Gly  
 275 280 285

Pro Pro Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Ala Leu Pro Ala His Ser Ser  
 290 295 300

Pro Gly Leu Pro Pro Pro Ala Leu Ser Pro Ser Lys Val His Gly Val  
 305 310 315 320

Arg Xaa Gly Gln Pro Ala Thr Ser Glu Thr Ala Glu Val Pro Ser Ser  
 325 330 335

Ser Gly Gly Pro Leu Val Thr Val Ser Thr Pro Leu His Gln Val Ser  
 340 345 350

Pro Thr Gly Leu Glu Pro Ser His Ser Leu Leu Ser Thr Glu Ala Lys  
 355 360 365

Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Ser Thr Leu Thr  
 370 375 380

Ala Leu His Ser Leu Glu Gln Thr Ser Pro Gly Leu Asn Gln Gln Pro  
 385 390 395 400

Gln Asn Leu Ile Met Ala Ser Leu Pro Gly Val Met Thr Ile Gly Pro  
 405 410 415

Gly Glu Pro Ala Ser Leu Gly Pro Thr Phe Thr Asn Thr Gly Ala Ser  
 420 425 430

Thr Leu Val Ile Gly Leu Ala Ser Thr Gln Ala Gln Ser Val Pro Val  
 435 440 445

Ile Asn Ser Met Gly Ser Ser Leu Thr Thr Leu Gln Pro Val Gln Phe  
 450 455 460

Ser Gln Pro Leu His Pro Ser Tyr Gln Gln Pro Leu Met Pro Pro Val  
 465 470 475 480

6/8

Gln Ser His Val Thr Gln Ser Pro Phe Met Ala Thr Met Ala Gln Leu  
 485 490 495

Gln Ser Pro His Ala Leu Tyr Ser His Lys Pro Glu Val Ala Gln Tyr  
 500 505 510

Thr His Thr Gly Leu Leu Pro Gln Thr Met Leu Ile Thr Asp Thr Thr  
 515 520 525

Asn Leu Ser Ala Leu Ala Ser Leu Thr Pro Thr Lys Gln Val Phe Thr  
 530 535 540

Ser Asp Thr Glu Ala Ser Ser Glu Ser Gly Leu His Thr Pro Ala Ser  
 545 550 555 560

Gln Ala Thr Thr Leu His Val Pro Ser Gln Asp Pro Ala Gly Ile Gln  
 565 570 575

His Leu Gln Pro Ala His Arg Leu Ser Ala Ser Pro Thr Val Ser Ser  
 580 585 590

Ser Ser Leu Val Leu Tyr Gln Ser Ser Asp Ser Ser Asn Gly Gln Ser  
 595 600 605

His Leu Leu Pro Ser Asn His Ser Val Ile Glu Thr Phe Ile Ser Thr  
 610 615 620

Gln Met Ala Ser Ser Ser Gln  
 625 630

<210> 3  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asn Gly Glu Glu Gln Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Asp  
 1 5 10 15

Pro Cys Ala Phe Gln Arg Gly Pro Ala Pro Glu Phe Ser Ala Ser Pro  
 20 25 30

Pro Ala Cys Leu Tyr Met Gly Arg Gln Pro Pro Pro Pro Pro His  
 35 40 45

7/8

Pro Phe Pro Gly Ala Leu Gly Ala Leu Glu Gln Gly Ser Pro Pro Asp  
 50 55 60

Ile Ser Pro Tyr Glu Val Pro Pro Leu Ala Asp Asp Pro Ala Val Ala  
 65 70 75 80

His Leu His His His Leu Pro Ala Gln Leu Ala Leu Pro His Pro Pro  
 85 90 95

Ala Gly Pro Phe Pro Glu Gly Ala Glu Pro Gly Val Leu Glu Glu Pro  
 100 105 110

Asn Arg Val Gln Leu Pro Phe Pro Trp Met Lys Ser Thr Lys Ala His  
 115 120 125

Ala Trp Lys Gly Gln Trp Ala Gly Gly Ala Tyr Ala Ala Glu Pro Glu  
 130 135 140

Glu Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu Glu  
 145 150 155 160

Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Ile Ser Arg Pro Arg Arg  
 165 170 175

Val Glu Leu Ala Val Met Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys Ile  
 180 185 190

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu Asp Lys Lys  
 195 200 205

Arg Gly Gly Gly Thr Ala Val Gly Gly Gly Gly Val Ala Glu Pro Glu  
 210 215 220

Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Leu Pro Pro  
 225 230 235 240

Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Ala Ala Pro Val Ala Ala  
 245 250 255

Arg Glu Gly Arg Leu Pro Pro Gly Leu Ser Ala Ser Pro Gln Pro Ser  
 260 265 270

8/8

Ser Val Ala Pro Arg Arg Pro Gln Glu Pro Arg  
275 280

<210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial peptide of human m-calpain or rabbit m-calpain showing high score in the local alignment between human m-calpain or rabbit m-calpain and human HNF-4alpha

<400> 4

Phe Lys Leu Pro Pro Gly  
1 5

<210> 5  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Partial peptide of human HNF-4alpha showing high score in the local alignment between human m-calpain or rabbit m-calpain and human HNF-4alpha

<400> 5

Tyr Lys Leu Leu Pro Gly  
1 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11046

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, A61P3/10//C07K7/06, C12N9/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K45/00, A61P3/10, C07K7/06, C12N9/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shih DQ. et al., Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2001 December, Vol.98, No.25, p.14189-91	1-57,64-66, 73-82,85-90, 92-94
A	Sturges MR. et al., Calcium-dependent inactivation of RNA polymerase III transcription., J.Biol.Chem., 1994 February, Vol.269, No.8, p.5712-9	1-57,64-66, 73-82,85-90, 92-94
A	Watt F. et al., Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain., Nucleic. Acid.Res., 1993 November, Vol.21, No.22, p.5092-100	1-57,64-66, 73-82,85-90, 92-94

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
23 October, 2003 (23.10.03)Date of mailing of the international search report  
25 November, 2003 (25.11.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11046

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SASAKI T. et al., Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates., J.Biol.Chem., 1984 October, Vol.259, No.20, p.12489-94	1-57, 64-66, 73-82, 85-90, 92-94

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11046

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 58-63, 67-72, 83-84

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 58 to 63, 67 to 72 and 83 to 84 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) (continued to extra sheet)

2. ☒ Claims Nos.: 91

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11046

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

The compound as claimed in claim 91 is specified by "an identification method according to any of claims 86 to 90" and, therefore, involves any compounds and medicinal compositions obtained by the identification methods.

However, no specific compound obtained by the identification methods is presented in the description. Thus, claim 91 is neither disclosed in the meaning within PCT Article 5 nor supported by the disclosure in the description in the meaning within PCT Article 6. Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is completely unknown what specific compounds are involved and what are not. Thus, the above claim is extremely unclear and does not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, no meaningful search can be made on the invention as claimed in the above claim.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P3/10 // C07K7/06, C12N9/64

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61P3/10, C07K7/06, C12N9/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Shih DQ. et al., Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec, Vol. 98, No. 25, p. 14189-91.	1-57, 64-66, 73-82, 85-90, 92-94
A	Sturges MR. et al., Calcium-dependent inactivation of RNA polymerase III transcription. J Biol Chem. 1994 Feb, Vol. 269, No. 8, p. 5712-9.	1-57, 64-66, 73-82, 85-90, 92-94

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 10. 03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Watt F. et al., Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. Nucleic Acids Res. 1993 Nov, Vol. 21, No. 22, p. 5092-100.	1-57, 64-66, 73-82, 85-90, 92-94
A	Sasaki T. et al., Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. J Biol Chem. 1984 Oct, Vol. 259, No. 20, p. 12489-94.	1-57, 64-66, 73-82, 85-90, 92-94

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 58-63, 67-72, 83-84 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
特許請求の範囲 58-63, 67-72, 83-84 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第 17 条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 91 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特別ページ参照
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第 I 欄- 2. )

請求の範囲 9 1 に記載の化合物は、「請求の範囲第 8 6 項から第 9 0 項のいずれかに 1 項に記載の同定方法」によって特定されており、当該同定方法で得られるあらゆる化合物及び医薬組成物を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該同定方法で得られる化合物としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲 9 1 は、P C T 5 条の意味での開示を欠き、また、P C T 6 条の意味での明細書の開示による裏付けを欠いている。さらに、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのが全く不明であって、前記クレームは著しく不明確であり、P C T 6 条における明確性の要件も欠いている。

したがって、前記クレームに記載された発明について有意義な調査をすることができない。